



Immunzytokine zur Steigerung der antitumoralen Aktivität von CAR- modifizierten Lymphozyten

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. Nat.)

Dissertation

von Aline Häcker (geb. Lindner)

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bodo Laube

Externer Betreuer: Prof. Dr. Winfried Wels

Darmstadt 2020

Häcker, Aline: Immunzytokine zur Steigerung der antitumoralen Aktivität von CAR-modifizierten Lymphozyten
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den
(Unterschrift)

Zusammenfassung

Durch die genetische Modifikation mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) sind zytotoxische Lymphozyten dazu in der Lage, spezifische Antigene zu erkennen und Zellen, die das entsprechende Antigen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, zu lysieren. CAR-Lymphozyten zeigten bisher insbesondere gegen hämatologische Malignitäten eine beeindruckende antitumorale Wirkung. Seit 2018 sind zwei CD19-spezifische CAR T-Zellprodukte (Kymriah von Novartis und Yescarta von Gilead) für die Behandlung von rezidierten/refraktären B-Zell-Leukämien und -Lymphomen in Europa zugelassen. CAR-Therapien für solide Tumoren zeigten dagegen trotz vielversprechender präklinischer Daten bisher nur eine geringe therapeutische Wirksamkeit in Patienten. Die erfolgreiche Behandlung von soliden Tumoren mit CAR-Effektorzellen wird unter anderem durch die heterogene Antigenexpression auf den Tumorzellen limitiert, da Antigen-negative Zielzellen durch CAR-Zellen nicht erkannt werden. Zudem etablieren solide Tumoren häufig ein Immun-hemmendes Tumormikromillieu, indem sie beispielsweise immunregulatorische Zellen rekrutieren und aktivieren, antiinflammatorische Zytokine sekretieren oder auch Liganden von *Immune Checkpoint*-Rezeptoren wie zum Beispiel PD-L1 (engl. *programmed cell death 1 ligand 1*) exprimieren (Martinez und Moon, 2019).

Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung neuer Varianten eines ErbB2 (HER2)-spezifischen CAR-Zellprodukts (NK-92/5.28.z), basierend auf der klinisch einsetzbaren natürlichen Killer (NK)-Zelllinie NK-92, welche zusätzlich zu dem ErbB2-spezifischen CAR, antagonistische Antikörperfusionsproteine mit Zytokindomäne (sogenannte Immunzytokine) gerichtet gegen PD-L1 exprimieren und diese in das Tumormikromillieu sekretieren. Durch die Sekretion der Immunzytokine sollen die hier generierten CAR NK-92 Zellen dazu befähigt werden, in der Tumorumgebung vorliegende Immunzellen zu stimulieren und durch die Blockade des PD-L1/PD-1-*Immune Checkpoints* bereits initiierte Antitumorreaktionen aufrechtzuerhalten und zu verstärken.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vier verschiedene Antikörperfusionsproteine mit Zytokindomäne generiert, ein Immunzytokin mit einer Interleukin-12 (IL-12)-Domäne (anti-PDL1-sclL12), ein Immunzytokin mit IL-15-Domäne (anti-PDL1-IL15) und zwei Immunzytokine mit einem IL-15-Superagonisten (anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1). Die rekombinanten Immunzytokine enthalten jeweils dasselbe Einzelketten-Antikörperfragment (engl. *single chain Fragment variable*, scFv), abgeleitet von dem antagonistischen, PD-L1-spezifischen Antikörper Atezolizumab (Tecentriq®, Genentech/Roche). Neben den Immunzytokinen wurde zudem als Kontroll-Protein ein PD-L1-spezifischer Miniantikörper (anti-PDL1-IgG4Fc), mit einem von Immunglobulin G4 (IgG4)-abgeleiteten Fc-Teil anstatt einer Zytokindomäne, entwickelt.

Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die rekombinanten Antikörperfusionsproteine zunächst in stabil transfizierten HEK293 Zellen produziert und anschließend aus den Zellkulturüberständen isoliert. Die aufgereinigten Antikörperfusionsproteine wurden biochemisch charakterisiert und die Funktionalität der enthaltenen Zytokin- und Antikörperdomänen *in vitro* untersucht. In Immunoblot-Analysen konnte bestätigt werden, dass die Antikörperfusionsproteine jeweils vollständig exprimiert vorlagen und für die Aktivität von Zytokinen wichtige Proteinglykosylierungen aufwiesen. Mittels Coomassie-Färbung konnte zudem die durch den Fc-Teil vermittelte Homodimerisierung des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers bestätigt werden. Die aufgereinigten Antikörperfusionsproteine waren jeweils dazu in der Lage, spezifisch an rekombinantes PD-L1-Protein und auch an PD-L1-positive Tumorzellen zu binden. Nach Stimulation mit den Immunzytokinen wurde in den Lysaten von NK-92/5.28.z Zellen eine Phosphorylierung der in den IL-12-/IL-15-Signalwegen involvierten Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT5 nachgewiesen. Dies bestätigte die Aktivierung der IL-12/15-Rezeptorkomplexe und somit die Funktionalität der in den Immunzytokinen enthaltenen Zytokindomänen. Die immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine wurde in Experimenten mit primären Immunzellen untersucht. Aus gesunden Spendern isolierte Lymphozyten wiesen nach Stimulation mit den Immunzytokinen jeweils eine erhöhte natürliche Zytotoxizität gegenüber der etablierten MHC-I-negativen Erythroleukämie-Zelllinie K562 auf. In gemischten Lymphozytenreaktionen (GLR) wurde die immunstimulatorische Funktion der generierten Antikörperfusionsproteine auf die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen untersucht. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper steigerte hierbei die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen während der GLR signifikant. Dies bestätigte die Wirkung des auch in den Immunzytokinen enthaltenen PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragments als *Immune Checkpoint*-Inhibitor. Die Immunzytokine induzierten aufgrund der enthaltenen zusätzlichen Zytokindomänen jeweils eine im Vergleich zu dem Miniantikörper höhere CD8⁺ T-Zellproliferation.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die ErbB2 (HER2)-spezifische CAR NK-Zelllinie NK-92/5.28.z mit lentiviralen Vektoren, codierend für jeweils eines der zuvor charakterisierten Antikörperfusionsproteine und das Markerprotein iRFP, transduziert. Die iRFP-positiven, erfolgreich transduzierten NK-92/5.28.z Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert, um Zellpools mit den Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen zu generieren. Mittels Immunpräzipitation konnte die Sekretion der Antikörperfusionsproteine durch die sortierten Zellpools zunächst bestätigt und anschließend in ELISA-Experimenten quantifiziert werden. Mit Ausnahme des IL-15-basierten Immunzytokins anti-PDL1-IL15 wurden die verschiedenen Antikörperfusionsproteine jeweils in vergleichbaren Mengen in den Zellkulturüberständen der genmodifizierten NK-92 Zellen nachgewiesen. Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 wurde dagegen im Vergleich zu den anderen Antikörperfusionsproteinen in einer deutlich geringeren Menge von den genmodifizierten

NK-92/5.28.z Zellen sekretiert. Die Antikörperfusionsprotein-Sekretion wurde durch die Kokultivierung der NK-Zellen mit MHC-I-negativen K562 oder ErbB2-positiven MDA-MB453 Zielzellen nicht signifikant beeinflusst. Auch eine Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy, wie sie in klinischen Studien mit NK-92 Zellen als Sicherheitsmaßnahme vor der Injektion der Zellen durchgeführt wird, hatte keinen signifikanten Effekt auf die Immunzytokin-Sekretion.

In Immunoblot-Analysen wurde in den Lysaten der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen auch ohne vorige Stimulation mit rekombinantem IL-12 oder IL-15 phosphoryliertes STAT4 beziehungsweise STAT5 detektiert, was belegt, dass die genmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen durch die von ihnen sekretierten Immunzytokine autokrin stimuliert werden. In den Lysaten der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen zeigte sich zudem eine im Vergleich zu den parentalen CAR NK-Zellen reduzierte Gesamtmenge an STAT4-Protein. Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen durch die ektopische Expression der IL-15-basierten Immunzytokine eine im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen erhöhte Proliferationsrate auf und konnten auch über längere Zeiträume hinweg unabhängig von exogenem IL-2 kultiviert werden.

In Zytotoxizitätsassays fiel auf, dass die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen im Vergleich zu den anderen Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen und den parentalen NK-92/5.28.z Zellen eine verminderte Zytotoxizität aufwiesen. Um zu überprüfen, ob die reduzierte Zytotoxizität der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen durch die anhaltende Aktivierung des IL-12-Signalwegs induziert wird, wurden unveränderte NK-92/5.28.z Zellen für 14 Tage mit höheren Dosen an rekombinantem IL-12 kultiviert. Nach Stimulation mit IL-12 zeigten die parentalen NK-92/5.28.z Zellen ebenfalls eine verminderte Tumorzelllyse, welche durch den Entzug von IL-12 jedoch wiederhergestellt werden konnte. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da in der Literatur beschrieben ist, dass das proinflammatorische Zytokin IL-12 die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen gegenüber Tumorzellen erhöhen kann. Zusammen mit der in den Immunoblot-Analysen gezeigten reduzierten STAT4-Expression in den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen, weisen die Daten des Zytotoxizitätsassays jedoch darauf hin, dass eine kontinuierliche Stimulation mit rekombinantem IL-12 oder dem Immunzytokin anti-PDL1-sclL12 in NK-92 Zellen womöglich eine erschöpfungsbedingte Reduktion der Zytotoxizität induziert. In Transwell-Experimenten wurde die parakrine Stimulation von primären Immunzellen durch die von den CAR NK-92 Zellen sekretierten Antikörperfusionsproteine untersucht. Die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen steigerten jeweils durch die Sekretion der Antikörperfusionsproteine die natürliche Zytotoxizität primärer Lymphozyten gegenüber MHC-I-negativen K562 Tumorzellen. In gemischten Lymphozytenreaktionen waren die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen dazu in der Lage, durch die Sekretion der IL-15-/IL-15-Superagonist-enthaltenden Immunzytokine die Proliferation

von CD8⁺ T-Zellen zu erhöhen. Die Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-Fc wurden hingegen nicht in ausreichenden Mengen von den CAR NK-92 Zellen sekretiert, um einen messbaren Effekt auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen auszuüben.

Abschließend wurde in immunkompetenten C57BL/6 Mäusen, in einem subkutanen Glioblastommodell mit GL261/ErbB2 Zellen, die antitumorale Wirkung der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen am Beispiel des NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellpools *in vivo* untersucht. In vorbereitenden *in vitro* Studien konnte die Bindung der Antikörperfusionsproteine an das von den GL261/ErbB2 Zellen endogen exprimierte murine PD-L1, wie auch die Sensitivität der GL261/ErbB2 Zellen gegenüber den ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen bestätigt werden. Die peritumorale Injektion von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 oder parentalen NK-92/5.28.z Zellen verzögerte während der Behandlungsphase das Wachstum großer, bereits etablierter GL261/ErbB2-Tumoren und reduzierte zum Teil sogar das Tumolvolumen. Sowohl die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen als auch die NK-92/5.28.z Ausgangszellen waren dazu in der Lage, in jeweils zwei Tieren der jeweiligen Behandlungsgruppe eine komplette Tumorabstoßung auszulösen. Nach Beendigung der CAR NK-Zelltherapie wuchsen in Mäusen, in welchen während der Behandlung keine vollständige Tumorabstoßung stattfand, die Tumoren jedoch wieder aus. Durch die Behandlung mit den Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen konnte kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil und auch kein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zu der Therapie mit den NK-92/5.28.z Ausgangszellen induziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ErbB2-spezifische CAR NK-Zelllinie NK-92/5.28.z nach lentiviraler Transduktion dazu in der Lage ist, immunstimulatorische Antikörperfusionsproteine zu sekretieren. Durch die ektopische Expression der Immunzytokine wurden die genmodifizierten CAR NK-Zellen autokrin stimuliert. In Transwell-Experimenten wurde zudem gezeigt, dass auch umgebende primäre Immunzellen durch die von den NK-92 Zellen sekretierten Antikörperfusionsproteine stimuliert werden können. In der abschließenden *in vivo*-Studie wiesen die NK 92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen jedoch keine gesteigerte antitumorale Wirkung im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen auf. Da die rekombinanten Immunzytokine wie *in vitro* nachgewiesen funktional sind, ist die nur begrenzte antitumorale Wirkung der NK 92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen wohl vor allem auf eine zu geringe Immunzytokinsekretion zurückzuführen. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, ob die Sekretion der Immunzytokine erhöht oder die immunstimulatorische Wirkung der Immunzytokine durch die Expression weiterer proinflammatorischer Proteine synergistisch gesteigert werden kann. Insgesamt stellt die genetische Modifikation von CAR-Lymphozyten mit Immunzytokinen einen interessanten Ansatz dar, um die Antitumoraktivität von CAR-Zelltherapeutika zu steigern.

| | |
|--|-----------|
| Ehrenwörtliche Erklärung..... | 3 |
| Zusammenfassung | 4 |
| 1. Einleitung..... | 12 |
| 1.1. Krebsentstehung und Wechselwirkung mit dem Immunsystem..... | 12 |
| 1.2. Krebs-Immuntherapie | 16 |
| 1.2.1. Antikörper-basierte Immuntherapien..... | 17 |
| 1.2.2. <i>Immune Checkpoint</i> -Inhibitoren | 22 |
| 1.2.3. Krebsimmuntherapien mit Zytokinen und Immunzytokinen..... | 27 |
| 1.2.4. Zelluläre Immuntherapien für die Krebs-Behandlung | 32 |
| 1.3. Ziel dieser Arbeit..... | 42 |
| 2. Material | 44 |
| 2.1. Laborgeräte und Apparaturen | 44 |
| 2.2. Verbrauchsmaterialien..... | 45 |
| 2.3. Chemikalien und Reagenzien..... | 46 |
| 2.4. Puffer und Lösungen | 46 |
| 2.5. Rekombinante Proteine | 47 |
| 2.6. Antikörper | 48 |
| 2.7. Plasmide..... | 49 |
| 2.8. Oligonukleotide | 51 |
| 2.9. Bakterienstämme | 52 |
| 2.10. Bakterienmedien und Antibiotika | 53 |
| 2.11. Zellkulturmedien und Zusätze | 54 |
| 2.12. Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen..... | 54 |
| 2.13. Mausstämme..... | 56 |
| 3. Methoden..... | 57 |
| 3.1. Molekularbiologische Techniken | 57 |
| 3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion | 57 |
| 3.1.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Dephosphorylierung linearisierter Plasmide | 58 |
| 3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten | 58 |
| 3.1.4. Isothermaler Zusammenbau nach Gibson | 59 |
| 3.1.5. DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese | 59 |
| 3.1.6. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.7. Herstellung von chemokompetenten Bakterien | 60 |
| 3.1.8. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> | 61 |
| 3.1.9. Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 61 |
| 3.1.10. Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Sequenzierung | 61 |
| 3.2. Proteinbiochemische Methoden | 62 |
| 3.2.1. Herstellung von Zelllysaten | 62 |
| 3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford..... | 62 |
| 3.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 63 |
| 3.2.4. Coomassie-Brillant-Blau-Färbung..... | 64 |
| 3.2.5. Immunoblot-Analyse | 65 |
| 3.2.6. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen | 66 |
| 3.2.7. Immunpräzipitation..... | 67 |
| 3.2.8. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)..... | 68 |
| 3.3. Zellbiologische Methoden | 69 |
| 3.3.1. Kultivierung von Zelllinien | 69 |
| 3.3.2. Bestimmung der Zellzahl | 69 |
| 3.3.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen..... | 69 |
| 3.3.4. Bestrahlung von Zellen | 70 |
| 3.3.5. Transfektion von Zellen mittels Polyethylenimin..... | 70 |
| 3.3.6. Transduktion von NK-92 Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln | 71 |
| 3.3.7. Selektion transduzierter NK-92 Zellen..... | 71 |
| 3.3.8. Proteinproduktion in stabil transfizierten HEK293 Zellen..... | 72 |
| 3.3.9. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes | 72 |
| 3.3.10. Durchflusszytometrische Analysen | 72 |
| 3.3.11. Zytotoxizitätsassay | 73 |
| 3.3.12. Proliferationsassay | 74 |
| 3.3.13. Gemischte Lymphozytenreaktion | 75 |
| 3.3.14. Transwell-Experimente | 76 |
| 3.4. <i>In vivo</i> Experimente | 79 |
| 3.4.1. Haltung von immunkompetenten Mäusen | 79 |
| 3.4.2. Induktion und Behandlung syngener GL261/ErbB2 Tumoren | 79 |
| 3.5. Statistische Analysen | 80 |
| 4. Ergebnisse | 81 |
| 4.1. Generierung und biochemische Charakterisierung PD-L1-spezifischer Immunzytokine..... | 81 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.1. Rekombinante Expression und Reinigung PD-L1-spezifischer Antikörperfusionsproteine..... | 81 |
| 4.1.2. Biochemische Charakterisierung der isolierten Antikörperfusionsproteine..... | 87 |
| 4.1.3. Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2..... | 93 |
| 4.1.4. Bindung an PD-L1 über die PD-L1-spezifische Antikörperdomäne | 93 |
| 4.1.5. Funktionalität der Zytokindomänen der PD-L1-spezifischen Immunzytokine | 99 |
| 4.1.6. Immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf primäre Immunzellen.... | 102 |
| 4.1.7. Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 bis 4.2.3..... | 110 |
| 4.2. Expression von Immunzytokinen in ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen..... | 111 |
| 4.2.1. Generierung Immunzytokine-kodierender lentiviraler Vektoren und Transduktion von CAR NK-92 Zellen..... | 111 |
| 4.2.2. Sekretion von Antikörperfusionsproteinen durch lentiviral transduzierte NK-92/5.28.z Zellen | 115 |
| 4.2.3. Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2 | 119 |
| 4.3. Funktionelle Charakterisierung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen..... | 120 |
| 4.3.1. Autokrine Stimulation der CAR NK-92 Zellen durch die Expression von Immunzytokinen | 120 |
| 4.3.2. Einfluss der Immunzytokin-Expression auf die Proliferation und die Zytotoxizität genmodifizierter CAR NK-92 Zellen..... | 122 |
| 4.3.3. Stimulation umgebender Immunzellen durch von CAR NK-92 sekretierte Immunzytokine..... | 129 |
| 4.3.4. Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3 | 135 |
| 4.4. Antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen in einem murinen <i>in vivo</i>-Tumormodell | 136 |
| Zusammenfassung des Abschnitts 4.5 | 140 |
| 5. Diskussion..... | 141 |
| 5.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanten PD-L1-spezifischen Immunzytokinen | 143 |
| 5.1.1. Biochemische Charakterisierung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine..... | 145 |
| 5.1.2. Antigenbindung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine..... | 147 |
| 5.1.3. Analysen zur Zytokinaktivität der PD-L1-spezifischen Immunzytokine | 149 |
| 5.1.4. Immunstimulatorische Wirkung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine | 150 |
| 5.2. Expression PD-L1-spezifischer Immunzytokine in ErbB2-spezifischen CAR NK-92/5.28.z Zellen | 157 |
| 5.2.1. Sekretion der PD-L1-spezifischen Immunzytokine durch CAR NK-92 Zellen..... | 158 |
| 5.2.2. Autokrine Stimulation der CAR NK-92 Zellen durch die Expression von Immunzytokinen | 162 |
| 5.2.3. Parakrine Stimulation primärer Immunzellen durch von CAR NK-92 Zellen sekretierte Immunzytokine | 166 |

| | |
|---|-----|
| 5.3. Antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen in einem murinen <i>in vivo</i> -Tumormodell | 169 |
| 5.4. Ausblick..... | 172 |
| 6. Literaturverzeichnis | 175 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis..... | 199 |

1. Einleitung

1.1. Krebsentstehung und Wechselwirkung mit dem Immunsystem

Etwa 500.000 Menschen erkranken jährlich in Deutschland an Krebs. Obwohl die Überlebenschancen bei einer Krebserkrankung heutzutage so hoch sind wie noch nie zuvor, ist noch ungefähr jeder vierte Todesfall in Deutschland durch Krebs bedingt (<https://www.krebsdaten.de>, Stand 2019). Neben karzinogenen Chemikalien, onkogenen Viren, genetischen Prädispositionen, UV- und ionisierender Strahlung, welche die Stabilität des Erbguts negativ beeinflussen, ist der größte Risikofaktor für die Erkrankung an Krebs das Lebensalter (Anand et al., 2008). Grund für das erhöhte Aufkommen an Krebserkrankungen im Alter ist, dass Zellen zunächst eine Reihe unterschiedlicher Eigenschaften durch Mutationen erlangen müssen, bevor ihre Transformation zu Tumorzellen vollendet ist (Hanahan et al., 2011). Meist sammeln sich die für die Krebsentstehung erforderlichen Mutationen über viele Jahre und Zell-Generationen hinweg unbemerkt an, bevor schließlich eine einzelne Zelle die Fähigkeit erlangt, einen Tumor auszubilden (Batlle und Clevers, 2017). Die dabei für die Karzinogenese notwendigen zellulären Veränderungen wurden von Hanahan und Weinberg als *Hallmarks of Cancer* zusammengefasst (Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan et al., 2011). Zu diesen *Hallmarks* gehören unter anderem die Immortalisierung der Zelle, eine erhöhte Proliferationsrate, die Fähigkeit in anderes Gewebe einzudringen und Metastasen auszubilden, sowie die Induktion der Tumorangiogenese. Ein weiterer wichtiger Schritt der malignen Entartung ist das Ausschalten der körpereigenen Kontrollsysteme, welche die Transformation blockieren. Die Krebsentstehung wird durch mehrere intrinsische und extrinsische Mechanismen verhindert. Die intrinsischen Kontrollmechanismen basieren dabei auf der Aktivität sogenannter Tumorsuppressoren, einer Gruppe von verschiedenen Proteinen, welche grundlegende zelluläre Funktionen wie die Zellteilung, Metabolismus, Seneszenz und den kontrollierten Zelltod (Apoptose) regulieren, aber auch die Integrität des Erbguts bewahren (Lee und Muller, 2010; Levitt und Hickson, 2002). Die Bedeutung der Tumorsuppressoren wird deutlich am Beispiel des Transkriptionsfaktors p53, dessen Gen *TP53* in bis zu 30 % - 50 % aller humanen Krebsarten Mutationen aufweist (Kastenhuber und Lowe, 2017). In gesunden Zellen liegt p53 nur in geringen Mengen vor, da es durch das regulatorische Protein MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*) kontinuierlich für den proteasomalen Abbau markiert wird. Wird die Expression von p53 durch DNA-Schäden oder weitere Stressfaktoren jedoch stabilisiert, induziert es zunächst Reparaturmechanismen und den Proliferationsstop der Zelle. Bei irreparablen Schäden kann p53 zudem über die Regulation verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie (engl. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) die Apoptose einleiten, um die Transformation der Zelle zu verhindern (Bieging et al., 2014;

Kastenhuber und Lowe, 2017). Durch das Ausschalten der Tumorsuppressoren oder durch einen gestörten Apoptose-Signalweg hebeln Tumorzellen diese ersten intrinsischen Kontrollmechanismen aus. Das zweite, extrinsische Kontrollsystem, welches bei der Tumortransformation umgangen werden muss, ist das Immunsystem.

Bereits 1909 mutmaßte Paul Ehrlich, dass die Entstehung von Krebs durch ein gestörtes Immunsystem begünstigt wird (Ehrlich, 1909). Knapp 50 Jahre später wurde das Konzept vom Immunsystem als Schutz gegen die Tumorentwicklung in der *cancer immunosurveillance*-Hypothese wieder aufgegriffen (Burnet, 1957). Heute ist bekannt, dass bestimmte Zellen des Immunsystems, wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen, in der Lage sind, Tumorzellen von gesunden Zellen zu unterscheiden und anschließend zu lysieren. Die Mechanismen, mit welchen T- und NK-Zellen entartete Zellen identifizieren, unterscheiden sich dabei voneinander. Damit T-Zellen entartete Zellen erkennen und anschließend lysieren können, müssen sie vorher durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cell*, APC) aktiviert werden und anschließend zu T-Effektorzellen reifen (Pennock et al., 2013). Die Aktivierung der T-Zellen während der sogenannten *Priming*-Phase findet im Lymphknoten statt. Dort treffen reife dendritische Zellen (engl. *dendritic cell*, DC) auf naive T-Zellen und präsentieren mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I oder II (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) auf ihrer Zelloberfläche aufgenommene Antigene (Thery und Amigorena, 2001). CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen, die mit ihrem T-Zellrezeptor den präsentierten MHC-Antigen-Komplex erkennen können, werden durch die Bindung weiterer, costimulatorischer Liganden wie CD80 und CD86 auf den DCs vollends aktiviert und durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen angeregt, zu T-Effektorzellen zu differenzieren (Chen und Flies, 2013; Harding et al., 1992; Zhu et al., 2010). Nach der Differenzierung können CD8⁺ T-Effektorzellen durch die erneute Bindung ihres T-Zellrezeptors an ihr spezifisches Antigen, Tumorzellen erkennen und diese ohne weitere costimulatorische Signale lysieren (London et al., 2000; Pennock et al., 2013). Die Tumorantigene, anhand derer T-Zellen transformierte Zellen erkennen, können in zwei Untergruppen, in tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene, unterteilt werden. Tumorspezifische Antigene (Neoantigene) sind durch Mutationen veränderte und damit als körperfremd erkannte Proteine, welche exklusiv auf Tumorzellen exprimiert werden. Bei tumorassoziierten Antigenen handelt es sich um Proteine, die auch von gesunden Körperzellen ubiquitär, gewebsspezifisch oder in bestimmten Differenzierungsstadien exprimiert werden, aber von den Tumorzellen überexprimiert werden (Coulie et al., 2014; Wagner et al., 2018). Die verschiedenen Tumorantigene werden innerhalb der Tumorzelle zu kurzen Peptidfragmenten prozessiert und mit dem MHC der Klasse I auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Bindung des MHC-Antigen-Komplexes durch den T-Zellrezeptor führt bei zytotoxischen T-Zellen zur Ausbildung einer immunologischen Synapse. Zuerst bindet die T-Zelle über verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1, ICAM-1 und

ICAM-2 fest an die Zielzelle, anschließend beginnt sich das Zytoskelett der T-Zelle zu verformen, um zytotoxische Granula gezielt an die Kontaktstelle mit der Tumorzelle zu transportieren (Bustos-Moran et al., 2016; Montoya et al., 2002). Während der Degranulation verschmelzen die Granula mit der Zellmembran, und zytotoxische Proteine, wie Perforin und Granzym B, werden sekretiert, um die Lyse der Tumorzelle einzuleiten (Pipkin und Lieberman, 2007). Um der Immunüberwachung durch T-Zellen zu entgehen, regulieren viele Tumoren im Lauf ihrer Entwicklung die Expression von MHC-Klasse I Molekülen herunter oder blockieren deren Transport an die Zelloberfläche (Concha-Benavente et al., 2016). Durch den Verlust der MHC-Klasse I Moleküle werden die Tumorzellen zwar „unsichtbar“ für T-Zellen, jedoch gleichzeitig auch sensibler gegenüber der Lyse durch NK-Zellen. NK-Zellen erkennen entartete Zellen im Gegensatz zu T-Zellen ohne vorherige Aktivierung und unabhängig von präsentierten Selbstantigenen über verschiedene Keimbahn-codierte Rezeptoren (Morvan und Lanier, 2016). Die Keimbahn-codierten NK-Zellrezeptoren können dabei sowohl aktivierende als auch inhibierende Signaldomänen enthalten. Letztlich entscheidet die Gesamtbilanz der über die NK-Zellrezeptoren induzierten inhibitorischen und aktivierenden Signale darüber, ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht. Eine Reihe von inhibitorischen Keimbahn-codierten NK-Zellrezeptoren, wie zum Beispiel die Killerzell-Immunoglobulin-artigen Rezeptoren (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*, KIR) und der heterodimere Rezeptor CD94-NKG2A, binden unabhängig von präsentierten Selbstpeptiden an Selbst-MHC-Klasse I Moleküle (Benson und Caligiuri, 2014; Borrego et al., 1998). Reguliert eine Tumorzelle die Expression der MHC-Klasse I Moleküle herunter, werden die NK-Zellen durch das Fehlen der inhibitorischen KIR- und CD94-NKG2A-Signale aktiviert. Dieser Mechanismus wird auch als Detektion von *missing self* beschrieben (Ljunggren und Karre, 1990). Weitere aktivierende NK-Zellrezeptoren, wie zum Beispiel die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (engl. *natural cytotoxicity receptor*, NCR) oder der C-Typ-Lektin-artige Rezeptor NKG2D, regulieren die Lyse anhand der Bindung von *induced self*-Liganden (Kruse et al., 2014; Pegram et al., 2011). Die *induced self*-Liganden, wie zum Beispiel MIC A und MIC B (engl. *MHC class I polypeptide-related sequence*), sind auf der Oberfläche von gesunden Zellen kaum vorhanden, werden jedoch von gestressten, virusinfizierten und transformierten Zellen überexprimiert. Mittels des aktivierenden, niedrig-affinen Fc-Rezeptors FcγRIII (CD16), sind NK-Zellen zusätzlich in der Lage, auch Antikörper-markierte (opsonierte) Zellen zu erkennen und diese durch die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) zu lysieren (Morvan und Lanier, 2016). Erhält eine NK-Zelle über die oben genannten Rezeptoren ein ausreichend hohes Aktivierungssignal, löst dies ähnlich wie in T-Zellen zunächst die Ausbildung einer immunologischen Synapse und anschließend die Sekretion von Perforin und Granzymen während der Degranulation der NK-Zelle aus.

In der bereits oben genannten *cancer immunosurveillance*-Hypothese wird das Immunsystem als Kontrollsystem dargestellt, welches der Tumorentwicklung entgegenwirkt, indem es entartete Zellen

erkennt und diese zerstört. Inzwischen wird vermutet, dass die Immunsystem-vermittelte Tumorumlyse nur einen einzelnen Aspekt in dem komplexen Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem und Tumorerkrankungen darstellt. So wurden zum Beispiel Infektionen und chronische Entzündungen wie Gastritis oder Morbus-Crohn mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht (Grivennikov et al., 2010). Verschiedene Langzeitstudien zeigten, dass durch die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten wie Aspirin das Auftreten von Darmkrebs und anderen Krebsarten um bis 50 % reduziert werden kann (Gupta und DuBois, 2001; Umar et al., 2016). Zudem wurde beobachtet, dass auch die weitere Entwicklung des Tumors durch das Immunsystem beeinflusst wird. So entwickelten zum Beispiel immundefiziente Mäuse nach Behandlung mit karzinogenen Chemikalien stärker immunogene Tumoren als Tiere mit intaktem Immunsystem (Shankaran et al., 2001). Grund hierfür ist der Selektionsdruck, der durch das Immunsystem auf den Tumor ausgeübt wird. Immunogene Tumorzellen können durch das Immunsystem erkannt und zerstört werden, während weniger immunogene Tumorzellen überleben und zum Tumor auswachsen. Dieser Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentwicklung wurde als *cancer immunoediting* beschrieben (Schreiber et al., 2011). Die von Schreiber et al. formulierte Hypothese der Krebsimmuneditierung erfolgt in drei Phasen. In der ersten Phase, der Eliminierungsphase, werden die Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt und zerstört. Gelingt es den Immunzellen in der Eliminierungsphase nicht, alle Tumorzellen zu zerstören, beginnt die Gleichgewichtsphase. Während der Gleichgewichtsphase wird zwar das Auswachsen eines klinisch sichtbaren Tumors weiterhin verhindert, durch den fortbestehenden Selektionsdruck des Immunsystems werden jedoch Tumorzellvarianten selektioniert, die immer weniger immunogen sind. In der letzten Phase, der *Escape*-Phase, erlangen einzelne Tumorzellen schließlich die Fähigkeit, dem Immunsystem zu entgehen, sie können auswachsen und einen Tumor ausbilden. Die Mechanismen, durch welche die Tumorzellen dem Immunsystem entfliehen, sind dabei sehr vielfältig. Häufig weisen Tumorzellen Defekte im Apoptosesignalweg auf oder etablieren ein hemmendes Tumormikromillieu, indem sie immunregulatorische Zellen aktivieren, antiinflammatorische Zytokine sekretieren oder auch Liganden von *Immune Checkpoint*-Rezeptoren wie PD-1 oder TIM-3, exprimieren (Schreiber et al., 2011). Krebs-Immuntherapien sind darauf ausgerichtet, diese *immune escape*-Mechanismen wieder umzukehren, die Tumorzellen für das Immunsystem zu sensibilisieren und eine effektive Immunreaktion gegen den Tumor auszulösen (Khalil et al., 2016).

1.2.Krebs-Immuntherapie

Unter dem Begriff der Krebs-Immuntherapeutika werden unterschiedliche Wirkstoffe biologischen Ursprungs zusammengefasst, welche eine Antitumorimmunreaktion auslösen oder verstärken können. Die Ursprünge der Krebs-Immuntherapie lassen sich bis ins 19. Jahrhundert zurückverfolgen, als der New Yorker Chirurg William Coley begann, Sarkom-Patienten mit einem Gemisch aus verschiedenen bakteriellen Lysaten zu behandeln. Das sogenannte „Coley Toxin“ wies zwar eine hohe Toxizität auf und löste in den Patienten zum Teil starke Fieberreaktionen aus, konnte jedoch tatsächlich bei einzelnen Patienten die Remission des Tumors bewirken (Coley, 1893). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden die Daten von Coley mehrfach reproduziert. In verschiedenen Studien wurde durch die Injektion bakterieller Lysate oder bakterieller Proteinlösungen eine Antitumorreaktion ausgelöst, deren Stärke mit dem Ausmaß der induzierten Fieberreaktion korrelierte (Axelrod et al., 1988; Karbach et al., 2012; Nauts et al., 1953). Die nachfolgende Entwicklung verschiedener Zytokin-basierter Krebsimmuntherapien gründete zum Teil auf dieser Beobachtung, dass die unspezifische Aktivierung des Immunsystems eine Immunreaktion gegen den Tumor induzieren kann. Die systemische Injektion von hochdosiertem Interleukin-2 (IL-2) war eine der ersten Zytokin-Immuntherapien zur Behandlung von Krebserkrankungen, wies aber aufgrund der unspezifischen Aktivierung von Immunzellen auch starke Nebenwirkungen wie das Kapillarlecksyndrom auf. Allerdings war die systemische Behandlung mit IL-2 die erste Krebs-Immuntherapie, welche sogar bei fortgeschrittenen Melanomen und Nierenkrebs eine langfristige Heilung bewirken konnte (Lotze et al., 1986; Rosenberg, 2014). Mit dem wachsenden Verständnis des Immunsystems und dessen Rolle in der Krebsentstehung wurden mit der Zeit viele weitere Immuntherapeutika entwickelt, welche nun spezifisch, an definierten Stellen des Immunsystems ansetzen und durch die gezielte Aktivierung bestimmter Immunzellpopulationen geringere Nebenwirkungen aufweisen. Die aktuellen Immuntherapieansätze können nach ihrem Wirkmechanismus in fünf Gruppen unterteilt werden, in therapeutische Antikörper, zelluläre Immuntherapien, onkolytische Viren, Tumorstoffe und Immunmodulatoren. Der Vorteil der Immuntherapeutika gegenüber bisherigen Standardbehandlungen bei Krebs, wie der Strahlen- und der Chemotherapie oder der chirurgischen Entfernung von entartetem Gewebe, liegt vor allem in der Möglichkeit, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Durch die Differenzierung von T- und B-Gedächtniszellen wären die Patienten auch nach Abschluss der Behandlung langfristig gegen das Auftreten eines Rezidivs geschützt. Der tatsächliche Nachweis der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, ausgelöst durch eine Immuntherapie, konnte bisher jedoch nur in *in vivo* Versuchen wie zum Beispiel in den von Zhang et al. durchgeführten *Rechallenge*-Experimenten erbracht werden. Zhang et al. konnten in einem syngenem immunkompetenten Glioblastom-Modell zeigen, dass Mäuse

nach der erfolgreichen Behandlung mit ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen dazu in der Lage waren, injizierte ErbB2-negative Glioblastomzellen abzustößen. Die nach Behandlung mit dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab teilweise jahrelang anhaltenden Remissionen bei Patienten mit metastasierendem Melanom lassen vermuten, dass auch im Menschen die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses durch die Behandlung mit Immuntherapeutika möglich ist (Schadendorf et al., 2015). Die zum Teil langanhaltende aber reversible B-Zell Aplasie nach der Behandlung mit CD19-spezifischen CAR T-Zellen spricht hingegen gegen die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Brudno und Kochenderfer, 2016).

1.2.1. Antikörper-basierte Immuntherapien

Therapeutische Antikörper bilden den größten Teilbereich der Immuntherapeutika. Bis heute wurden 76 monoklonale Antikörper (inklusive *Biosimilars*, <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/> Stand 2019) von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen, mehr als 30 davon für die Behandlung oder Diagnose von Tumorerkrankungen.

Der erste Meilenstein in der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern war 1975 die Erfindung der Hybridom-Technologie, mit deren Hilfe es zum ersten Mal möglich war, Antikörper mit derselben Antigen-Bindungsstelle (demselben Epitop) in großen Mengen zu produzieren (Köhler und Milstein, 1975). Die ersten mit der Hybridom-Technologie hergestellten Antikörper waren noch murinen Ursprungs. Der Nachteil von murinen Antikörpern ist, dass sie nur mit geringer Affinität an humane Antikörper-Rezeptoren binden und dadurch eine geringe Serum-Halbwertszeit und Aktivität im Menschen aufweisen (Ober et al., 2001). Außerdem sind murine Antikörper aufgrund ihrer spezieisfremden Proteinstruktur immunogen und führen im Menschen häufig zur Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMA), welche den therapeutischen Antikörper binden und neutralisieren können (Goldstein et al., 1986). Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden durch gentechnische Methoden verschiedene Bereiche der murinen Antikörper durch humane Proteinsequenzen ersetzt. Das Resultat waren chimäre und humanisierte Antikörper (Jones et al., 1986; Morrison et al., 1984). Chimäre Antikörper enthalten noch die gesamten murinen, variablen Antikörperdomänen (V_L und V_H), lediglich die konstanten Domänen sind durch humane Proteinsequenzen ersetzt. Bei humanisierten Antikörpern stammen nur noch die Antigen-bindenden, komplementäritätsbestimmenden Regionen (engl. *complementarity determining regions*, CDRs) aus der Maus (Abbildung 1.1). Inzwischen ist es möglich, komplett humane Antikörper durch den Einsatz

von humanisierten Mausstämmen oder Antikörperbibliotheken herzustellen (Green et al., 1994; Jostock et al., 2004; Lonberg et al., 1994). Mittels Antikörper-*Engineering* können zudem neuartige rekombinante Antikörperformate hergestellt werden, welche modifizierte Eigenschaften wie zum Beispiel eine erhöhte Affinität für Fc-Rezeptoren, eine verlängerte Serum-Halbwertszeit oder eine verbesserte Gewebsinfiltration aufweisen (Carter, 2006; Kontermann, 2011). Momentan gehören die meisten der zugelassenen therapeutischen Antikörper der Immunglobulin G (IgG)-Klasse an. Allerdings wurden in den letzten Jahren vermehrt auch rekombinante Antikörperformate wie zum Beispiel murine und humane Fab-Antikörper (engl. *Fragment antigen binding*, Fab), Antikörper-Wirkstoffkonjugate oder auch bispezifische Antikörper von der FDA zugelassen (Elgundi et al., 2017). Da die meisten rekombinanten Antikörperformate ebenfalls von der Grundstruktur eines IgG-Antikörpers abgeleitet sind, wird im Folgenden der Aufbau von humanem Immunglobulin G beschrieben (Abbildung 1.1). IgG-Antikörper bestehen aus insgesamt zwei schweren und zwei leichten Peptid-Ketten, die über mehrere Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Die schweren Antikörperketten besitzen drei konstante (C_H1 , C_H2 und C_H3) und eine variable Domäne (V_H), welche über eine flexible Gelenk-Region (*hinge*-Region) miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen hingegen nur aus einer einzelnen konstanten (C_L) und einer variablen Domäne (V_L). Jeweils eine leichte Kette bildet zusammen mit V_H und C_H1 einer schweren Kette ein Antigen-bindendes Fab-Fragment (Schroeder et al., 2010). Die Antigenbindungsstelle, das Paratop, wird aus jeweils drei relativ kleinen hypervariablen Proteinbereichen in den variablen Domänen V_H und V_L , den CDRs, ausgebildet (Schroeder et al., 2010). Die konstanten Domänen C_H2 und C_H3 der beiden schweren Ketten bilden zusammen die Fc-Domäne (engl. *Fragment crystallizable*, Fc) des Antikörpers. Diese wird durch verschiedene Fc-Rezeptoren und Proteine des Immunsystems gebunden und vermittelt viele Effektorfunktionen des Antikörpers (Nimmerjahn und Ravetch, 2007; Scott et al., 2012).

Die zentrale Funktion von Antikörpern ist die Markierung von Antigenen für das Immunsystem, auch Opsonierung genannt. Durch Fc-Rezeptoren können Immunzellen opsonierte Antigene erkennen und diese durch Phagozytose aufnehmen (engl. *antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) oder opsonierte Zellen und Pathogene durch die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) lysieren (Scott et al., 2012; Tay et al., 2019). Eine weitere Effektorfunktion von Antikörpern ist die Aktivierung des Komplementsystems. In der komplementabhängigen Zytolyse (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC) binden Komplement-Proteine an IgG-Antikörper und bilden durch einen Membranangriffskomplex eine Pore in der Zielzellmembran aus, wodurch die opsonierte Zelle lysiert wird (Sorman et al., 2014). Die unterschiedlichen IgG-Subklassen (IgG1-4) werden mit verschieden hoher Affinität von Fc-Rezeptoren und Komplementproteinen gebunden, wodurch ADCC und CDC je nach IgG-Subklasse unterschiedlich stark ausgelöst werden. Humanes IgG1 und IgG3 sind zum Beispiel besser dafür geeignet, ADCC und

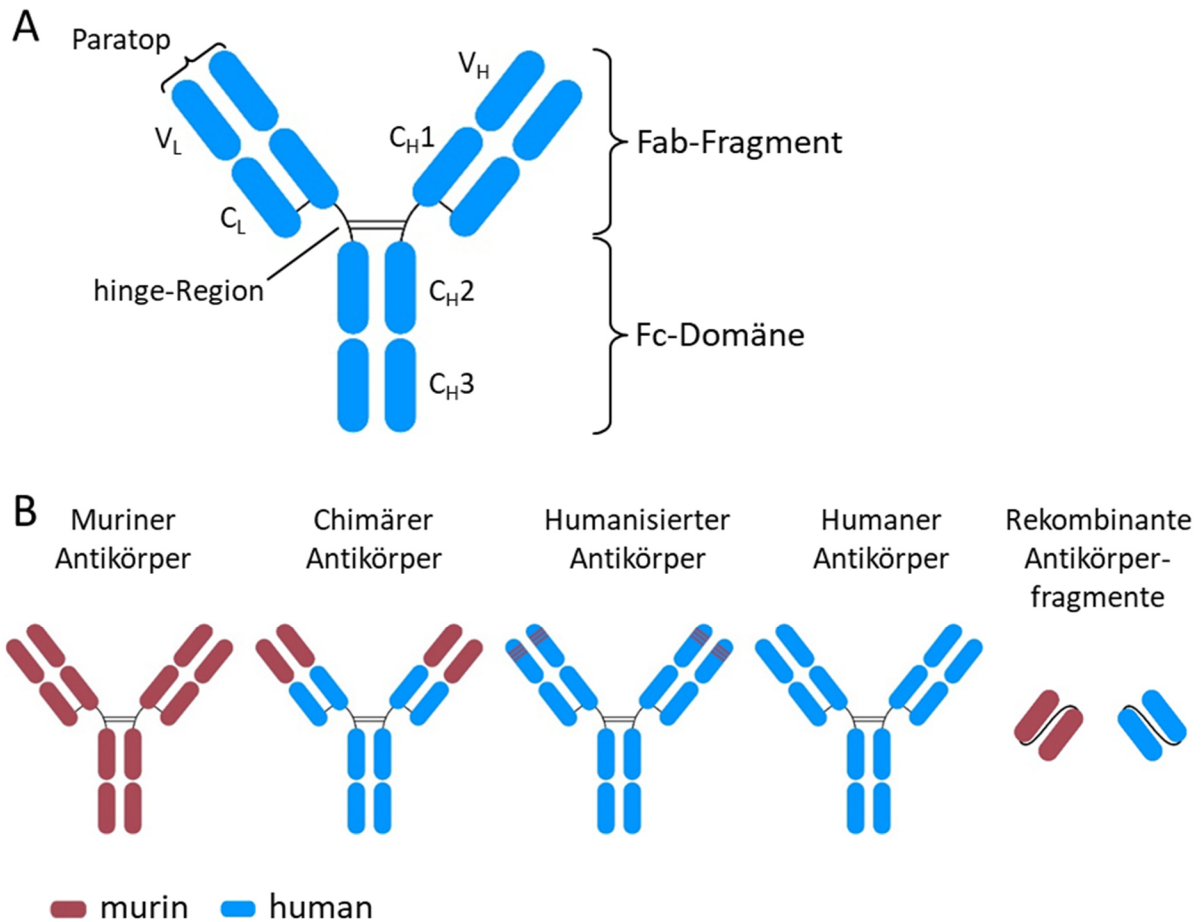


Abbildung 1.1: **A) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.** Immunglobuline der Klasse G bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Peptid-Ketten, die über mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das Antigen-bindende Fab (*Fragment antigen binding*)-Fragment besteht aus den beiden variablen Domänen V_H und V_L , und den konstanten Domänen C_{H1} und C_L . Die variable Domänen V_H und V_L enthalten jeweils drei CDRs (*complementarity determining regions*), hypervariable Proteinbereiche, die zusammen das Paratop bilden. Die Fc (*Fragment crystallizable*)-Domäne enthält jeweils die beiden konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} der beiden schweren Ketten und ist über eine bewegliche Gelenk (*hinge*)-Region mit den Fab-Fragmenten verbunden. **B) Evolution der therapeutischen Antikörper.** Die ersten mit der Hybridom-Technologie hergestellten Antikörper waren murinen Ursprungs. Chimäre Antikörper besitzen noch die murinen variablen Domänen, während die konstanten Domänen bereits humanen Ursprungs sind. Humanisierte Antikörper enthalten nur noch die Antigen-bindenden CDRs aus der Maus. Komplett humane Antikörper können durch Immunisierung transgener Mäuse oder mittels Antikörperbibliotheken generiert werden. Mittels gentechnischer Methoden werden neuartige, rekombinante Antikörperstrukturen generiert wie zum Beispiel die hier dargestellten scFv (*single chain Fragment variable*)-Antikörperfragmente.

CDC auszulösen als humane Antikörper der Subklasse IgG2 und IgG4 (Davies und Sutton, 2015; Sensel et al., 1997). Eine weitere Funktion, die durch die Fc-Domäne des Antikörpers vermittelt wird, ist der Antikörper-Transport mittels des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) (Pyzik et al., 2015). IgG-Antikörper sind die am zweithäufigsten vorliegenden Proteine im Blut und werden kontinuierlich von Endothelzellen und Monozyten durch Endozytose aufgenommen. Um den proteasomalen Abbau der internalisierten Antikörper zu verhindern, bindet der FcRn in den Lysosomen, unter den dort

vorliegenden sauren pH-Werten, mit hoher Affinität an die IgG-Antikörper und führt diese wieder zurück an die Zelloberfläche. An der Zelloberfläche, unter physiologischen Bedingungen, werden die IgG-Antikörper anschließend wieder entlassen (Ward et al., 2003). Unter anderem wegen diesem *Recycling*-Mechanismus weisen IgG-Antikörper eine deutlich höhere Serum-Halbwertszeit auf als andere Plasmaproteine und Antikörper-Isotypen. Der FcRn vermittelt neben diesem Antikörper-*Recycling* auch den Antikörper-Transport zwischen dem maternalen Blutkreislauf und dem Blutkreislauf eines Embryos/Fötus, und ist dadurch verantwortlich für die Ausbildung eines passiven Immunschutzes für das ungeborene Kind (Leach et al., 1996).

Einige Antikörper können auch unabhängig von der Fc-Domäne Effektorfunktionen vermitteln. Bei agonistischen und antagonistischen Antikörpern weist zum Beispiel auch das Paratop eine Effektorfunktion auf. Antagonistische Antikörper wirken, indem sie die Interaktion von extrazellulären oder Zelloberflächen-Proteinen, meist Rezeptoren, mit ihren natürlichen Liganden inhibieren. Agonistische Antikörper hingegen aktivieren Rezeptoren durch ihre Bindung und können so den natürlichen Liganden eines Rezeptors ersetzen. Die Einsatzmöglichkeiten für antagonistische und agonistische Antikörper in der Krebsimmuntherapie sind sehr vielfältig. Häufig werden sie verwendet, um durch die Bindung von regulatorischen Rezeptoren und Liganden Immunreaktionen zu modulieren (siehe *Immune Checkpoint*-Inhibitoren, Kapitel 1.2.2). Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für antagonistische Antikörper ist die Inhibition von Tumorwachstum-fördernden Signalwegen. Der ErbB2 (HER2)-spezifische, antagonistische Antikörper Pertuzumab (Genentech/Roche) ist zum Beispiel in der Lage, die für die Signalinduktion notwendige Dimerisierung des Rezeptors ErbB2 mit anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie zu blockieren. Durch die Blockade der ErbB2-induzierten *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase- und Protein Kinase B (PKB)/Akt-Signalwege hemmt Pertuzumab das Tumorwachstum in ErbB2-überexprimierenden *in vivo* Brustkrebsmodellen (Agus et al., 2002). In der Kombinationstherapie mit Trastuzumab, einem weiteren ErbB2-Antikörper, und Docetaxel verlängerte Pertuzumab die mittlere Überlebensdauer von Brustkrebspatientinnen mit ErbB2-positiven metastasierenden Tumoren signifikant (Swain et al., 2013). Agonistische Antikörper hingegen können zum Beispiel eingesetzt werden, um durch die spezifische Bindung von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor- α Rezeptorfamilie den extrinsischen Apoptose-Signalweg auszulösen und dadurch Tumorzellen direkt abzutöten (Wajant, 2015).

Rekombinante, bispezifische Antikörper sind ebenfalls in der Lage, unabhängig von der Fc-Domäne Effektorfunktionen zu vermitteln. Häufig werden sie für die Antigen-spezifische Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen eingesetzt (Dahlen et al., 2018; Kontermann und Brinkmann, 2015). Ein Beispiel hierfür sind die rekombinanten BiTE-Antikörper (engl. *bispecific T-cell engager*, BiTE), welche T-Effektorzellen MHC-unabhängig spezifisch gegen Tumorzellen richten und zu einer

Antitumorreaktion stimulieren (Huehls et al., 2015; Kontermann und Brinkmann, 2015). BiTE-Antikörper bestehen jeweils aus zwei verschiedenen Einzelketten-Antikörperfragmenten (engl. *single chain Fragment variable*, scFv), welche über einen *Linker* zu einem bispezifischen Antikörpermolekül fusioniert sind. Während eines der beiden scFv-Antikörperfragmente mit niedriger Affinität an CD3 bindet und für die Aktivierung der T-Zellen zuständig ist, bindet das zweite scFv-Antikörperfragment mit hoher Affinität an ein Tumorantigen und etabliert so eine enge räumliche Bindung zwischen T-Zellen und Zielzellen. Die geringe Bindungsstärke der CD3-spezifischen Antikörperdomäne gewährleistet, dass die monovalente Bindung des BiTE-Antikörpers nicht ausreicht, um in Abwesenheit von Zielzellen bereits die T-Zellaktivierung auszulösen. Erst durch die Bindung einer Zielzelle und die daraus resultierende multivalente Präsentation der BiTE-Antikörper werden die T-Zellen aktiviert (Brischwein et al., 2007). Die Wirksamkeit der BiTEs wurde bisher in mehreren klinischen Studien für verschiedene Tumorarten und für verschiedene Tumorantigene gezeigt (Liu et al., 2019; Sedykh et al., 2018). Der CD19-spezifische BiTE-Antikörper Blinatumomab verlängerte zum Beispiel in klinischen Studien die Überlebensdauer von Patienten mit akuter lymphatischer B-Zell Leukämie (B-ALL) signifikant und erzielte zudem eine höhere Anzahl an Vollremissionen im Vergleich zur chemotherapeutischen Standardtherapie (Kantarjian et al., 2017; Topp et al., 2015). Blinatumomab ist aufgrund dieser Behandlungserfolge seit 2014 von der FDA für die Behandlung von B-ALL zugelassen und seit 2015 auch in Europa auf dem Markt erhältlich. Neben einer Vielzahl an T-Zell-aktivierenden, bispezifischen Antikörpern wurden bisher nur einzelne Antikörper entwickelt, welche auch alternative Immunzellpopulationen aktivieren (Koch und Tesar, 2017; Kontermann und Brinkmann, 2015). Für die Rekrutierung von Makrophagen oder NK-Zellen wurden unter anderem verschiedene bispezifische Antikörper generiert, die den Fc-Rezeptor FcγRIII (CD16) binden. Ein Beispiel für einen solchen NK-Zell- und Makrophagen-aktivierenden bispezifischen Antikörper ist AFM13 (Affimed), welcher neben CD16 spezifisch an CD30, ein mit Hodgkin-Lymphomen assoziiertes Tumorantigen, bindet (Koch und Tesar, 2017; Rothe et al., 2015; Smith et al., 1993).

Eine weitere Gruppe von therapeutischen Antikörpern, welche ebenfalls ohne Fc-Domäne eine antitumorale Wirkung aufweisen können, sind die Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (engl. *antibody drug conjugate*, ADC). ADCs sind Antikörper, die mit einem therapeutischen Wirkstoff gekoppelt wurden (Bakhtiar, 2016). Der Wirkmechanismus der ADCs beruht darauf, dass der Antikörper spezifisch gegen ein Tumorantigen gerichtet ist und durch die Bindung zytotoxische Reagenzien wie Radionuklide oder Zytostatika an die Tumorzelle lenkt. Die Tumorzelle internalisiert anschließend das gebundene ADC, der Wirkstoff wird in der Zelle entlassen und kann dort seine Aktivität entfalten. Die Effektivität der ADCs ist wie auch bei anderen Antikörper-basierten Therapien von der gewählten Zielstruktur abhängig. Das Zielantigen sollte tumorspezifisch sein und nicht von gesunden Zellen exprimiert werden. Zusätzlich muss das Antigen bei ADCs auch internalisierbar sein, damit der

Wirkstoff nach der Bindung des Antigens in die Zelle gelangen kann (Bakhtiar, 2016). Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Funktionalität der ADCs bestimmt, ist die Entlassung des Wirkstoffs innerhalb der Tumorzelle. Der in den ADCs enthaltene *Linker* muss zum einem stabil genug sein, um zu verhindern, dass die zytotoxischen Reagenzien sich bereits außerhalb der Zelle ablösen und systemisch wirken können. Andererseits muss der Wirkstoff in der Zelle von dem Antikörper abgespalten werden, um in das Zytoplasma der Tumorzelle zu gelangen und wirken zu können (Bakhtiar, 2016). Aktuell sind mit KADCYLA®, einem ErbB2-spezifischen ADC für die Behandlung von Brustkrebs, und Adcetris®, einem CD30-spezifischen ADC für die Behandlung von Hodgkin Lymphomen und anaplastisch-großzelligen Lymphomen, zwei ADCs von der FDA zugelassen (Thomas et al., 2016). Mit über 100 aktiven klinischen Studien bilden die ADCs neben den *Immune Checkpoint*-Inhibitoren (siehe Kapitel 1.2.2) momentan eine der am schnellsten fortschreitenden Entwicklungen innerhalb der Wirkstoffgruppe der therapeutischen Antikörpern.

1.2.2. *Immune Checkpoint*-Inhibitoren

Unter *Immune Checkpoints* werden stimulatorische und inhibitorische Signalwege zusammengefasst, welche die Immunantwort regulieren und Autoimmunreaktionen verhindern (Pardoll, 2012a). Im Zusammenhang mit Krebsimmuntherapien sind insbesondere inhibitorische *Immune Checkpoints* in den Fokus gerückt. Tumorzellen können durch die Aktivierung dieser Signalwege umgebende Immunzellen beeinflussen und einer Abstoßung entgehen (Pardoll, 2012a; Zou und Chen, 2008). Dies basiert häufig auf einer erhöhten Expression von *Immune Checkpoint*-Liganden auf den Tumorzellen. Bei der *Immune Checkpoint*-Blockade werden Antikörper, sogenannte *Immune Checkpoint*-Inhibitoren, eingesetzt, um die Interaktion zwischen den inhibitorischen Rezeptoren auf den Immunzellen und den Liganden auf den Tumorzellen zu blockieren und so das Immunsystem zu reaktivieren.

Der erste von der FDA und der europäischen Arzneimittel-Agentur (engl. *European Medicines Agency*, EMA) zugelassene *Immune Checkpoint*-Inhibitor war Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb), ein antagonistischer IgG1-Antikörper gerichtet gegen das T-Zell Antigen CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*). CTLA-4 wird konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) und aktivierungsbedingt auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert, während die dazugehörigen Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APCs exprimiert werden (Rudd et al., 2009). CTLA-4 reguliert die Aktivierung von T-Zellen während der *Priming*-Phase, indem es mit dem aktivierenden, costimulatorischen Rezeptor CD28 um die Bindung von CD80 und CD86 konkurriert (Masteller et al., 2000). CTLA-4 weist dabei eine vielfach höhere Bindungsaffinität gegenüber CD80 und CD86 auf als CD28. Zusätzlich kann

CTLA-4 die gebundenen Liganden über Transendozytose von der Oberfläche der APCs entfernen und somit ihre Interaktion mit CD28 verhindern (Qureshi et al., 2011). Neben diesen extrinsischen Effektorfunktionen ist CTLA-4 zudem in der Lage, die T-Zellaktivierung über weitere intrinsische Mechanismen zu inhibieren. In Studien von Lee et al. wurde gezeigt, dass CTLA-4 über die indirekte Assoziation mit der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 (engl. *Src homology 2-containing tyrosine phosphatase-2*) der Phosphorylierung des T-Zellrezeptors entgegenwirken kann (Lee et al., 1998). Die sogenannte *reverse stop-signal*-Theorie besagt hingegen, dass CTLA-4 die Zellmobilität der T-Zellen während des T-Zell-*Primings* erhöht und dadurch die Zeit für die Antigenpräsentation limitiert (Brunner-Weinzierl und Rudd, 2018; Schneider et al., 2006). Durch CTLA-4-spezifische *Immune Checkpoint*-Inhibitoren wird die Aktivierungsschwelle beim T-Zell-*Priming* herabgesetzt und eine größere Anzahl an T-Zell-Klonen wird aktiviert, welche dann eine Immunreaktion gegen den Tumor initiieren können (Robert et al., 2014). In verschiedenen murinen Tumormodellen wurde zudem gezeigt, dass CTLA-4-spezifische *Immune Checkpoint*-Inhibitoren immunsuppressive T_{Reg}-Zellen inhibieren und für die Lyse durch ADCC markieren können (Selby et al., 2013). Daten von Romano et al. und Arce Vargas et al. deuten darauf hin, dass dieser zusätzliche Wirkmechanismus auch im Menschen möglich ist (Arce Vargas et al., 2018; Romano et al., 2015).

Ein weiterer Angriffspunkt für eine *Immune Checkpoint*-Blockade ist der Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD-1). PD-1 ist ähnlich wie CTLA-4 ein inhibitorischer Corezeptor und wird auf aktivierten T-Zellen, aber auch auf vielen anderen Immunzellen wie zum Beispiel B-Zellen, NK-Zellen, DCs und aktivierten Monozyten exprimiert (Keir et al., 2008; Nishimura et al., 1996). Auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wird die PD-1-Expression durch Aktivierung des T-Zellrezeptors oder auch durch Stimulation mit Zytokinen der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten-Familie, wie IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21, induziert (Agata et al., 1996; Kinter et al., 2008). Während die transiente Expression von PD-1 einen normalen Regulationsmechanismus während der T-Zellaktivierung darstellt, wird die anhaltende Expression von PD-1 während einer chronischen Virusinfektion oder einer Krebserkrankung, mit einem erschöpften beziehungsweise dysfunktionalen Phänotyp der T-Zellen assoziiert (Ahmadzadeh et al., 2009; Day et al., 2006; Thommen und Schumacher, 2018). PD-1 bindet die beiden Liganden PD-L1 und PD-L2, welche unterschiedliche Funktionen im Immunsystem vermitteln (Dong et al., 2017). PD-L1 reguliert die periphere Immuntoleranz und wird konstitutiv auf vielen verschiedenen Zell- und Gewebetypen exprimiert. Die Expression von PD-L1 kann zudem durch Entzündungssignale wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ), oder in Lymphozyten durch deren Aktivierung induziert werden (Eppihimer et al., 2002; Yamazaki et al., 2002). Die Expression von PD-L2 ist im Gegensatz zu PD-L1 auf bestimmte APCs begrenzt und wird mit der Inhibition der T-Zellaktivierung in lymphoiden Organen in Verbindung gebracht (Zhong et al., 2007). Mehrere Studien haben aufgezeigt, dass solide Tumoren häufig PD-L1, seltener auch PD-L2 überexprimieren, und dass die Expression der

PD-1-Liganden mit einem schlechteren Verlauf bei Krebserkrankungen assoziiert ist (Patel und Kurzrock, 2015). Die molekularen Signalwege und Mechanismen, die PD-L1 dazu befähigen, das Immunsystem zu modulieren und die Immunzell-vermittelte Tumorlyse zu inhibieren, sind vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt. Die bisher am besten verstandene Funktion von PD-L1 ist die Hemmung der T-Zellaktivierung durch Interaktion mit PD-1. Die Bindung der Liganden an PD-1 induziert zunächst die Phosphorylierung zweier Signal-Motive, des ITIM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) und des ITSM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), innerhalb der Zytoplasmadomäne von PD-1, wodurch die Tyrosin-Phosphatasen SHP-2 und SHP-1 rekrutiert werden (Chemnitz et al., 2004; Okazaki et al., 2001). SHP-2 dephosphoryliert anschließend verschiedene T-Zellrezeptor-assoziierte Proteine wie CD3 ζ , ZAP70 und PKC θ und wirkt so der Aktivierung des T-Zellrezeptors entgegen (Sheppard et al., 2004). Für SHP-1 wurde ebenfalls eine Interaktion mit ZAP70 nachgewiesen, allerdings ist nicht sicher, ob SHP-1 tatsächlich in den PD-1-vermittelten Signalwegen involviert ist oder unabhängig von PD-1 die T-Zellaktivierung reguliert (Hebeisen et al., 2013; Plas et al., 1996). Schließlich resultiert die Aktivierung von PD-1 in der Hemmung der PI3K/Akt- und MAPKinase-Signalwege, wodurch die Proliferation, Zytokinproduktion und zytolytische Aktivität der T-Effektorzellen reduziert wird (Sheppard et al., 2004). Interessanterweise scheint PD-1 in immunregulatorischen T_{Reg}-Zellen den gegenteiligen Effekt zu induzieren. Proliferation und Aktivität von T_{Reg}-Zellen werden durch die Bindung von PD-1 erhöht (Francisco et al., 2009). PD-L1 ist in der Lage, auch über die Interaktion mit CD80, einem zweiten Bindungspartner, T-Effektorzellen zu inhibieren.

Antagonistische Antikörper, welche spezifisch die PD-L1/CD80 Bindung blockieren, konnten *in vivo* die T-Zell-Expansion erhöhen und die T-Zell-Anergie reduzieren (Butte et al., 2007; Butte et al., 2008; Park et al., 2010). Neben diesen indirekt vermittelten immunregulatorischen Effekten wird zudem vermutet, dass PD-L1 selber auch in der Lage ist, intrazelluläre Signale zu induzieren. Die Überexpression von PD-L1 wurde zum Beispiel mit einer reduzierten Sensitivität von Tumorzellen gegenüber proapoptotischen Signalen und der Regulation des Glukose-Stoffwechsels in Verbindung gebracht (Azuma et al., 2008; Escors et al., 2018). Antagonistische Antikörper, die den PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoint* blockieren, bewirkten in verschiedenen *in vivo* Tumormodellen langanhaltende Antitumorreaktionen. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser antitumoralen Effekte sind aufgrund der weitverbreiteten Expression von PD-1 auf Immunzellen und der unterschiedlichen Funktionen von PD-L1 ebenfalls noch nicht komplett aufgeklärt und vermutlich multifaktoriell. Einer der Hauptwirkmechanismen der PD-1/PD-L1-Blockade ist die Regenerierung der erschöpften T-Effektorzellen. So konnten PD-L1-spezifische *Immune Checkpoint*-Inhibitoren die Proliferation, Zytokin-Produktion und zytolytische Aktivität von T-Effektorzellen wieder herstellen (Blank et al., 2004; Hirano et al., 2005). Andererseits können auch andere Immunzellpopulation wie NK-Zellen, B-Zellen

und dendritische Zellen durch die PD-1/PD-L1-Blockade stimuliert werden und potenziell zu einer Antitumorreaktion beitragen (Benson et al., 2010; Brown et al., 2003; Buermann et al., 2016; Hsu et al., 2018; Thibult et al., 2013). Auch die Depletion oder Inhibition von T_{Reg}-Zellen, ähnlich wie bei der *Immune Checkpoint*-Blockade von CTLA-4, ist ein denkbarer Wirkmechanismus bei der Behandlung mit PD-L1/PD-1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren, konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Inzwischen wurden von der FDA zwei antagonistische Antikörper gerichtet gegen PD-1 (Pembrolizumab und Nivolumab) und drei weitere *Immune Checkpoint*-Inhibitoren spezifisch für PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab) zugelassen (<https://medi-paper.com/us-fda-approved-immune-checkpoint-inhibitors-approved-immunotherapies>, Stand 2019).

Die Entwicklung der *Immune Checkpoint*-Inhibitoren war sicherlich eine der wegweisenden Entwicklungen auf dem Gebiet der Krebs-Immuntherapien in den letzten Jahren. So war Ipilimumab der erste medizinische Wirkstoff nach den Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, welcher auch bei schwer zu behandelnden Krebsarten wie dem metastasierenden Melanom die mittlere Überlebensdauer verlängern und die Gesamtüberlebensrate der Patienten signifikant erhöhen konnte (Schadendorf et al., 2015). Die klinischen Ergebnisse der PD-1-Blockade übertrafen die von Ipilimumab sogar noch einmal. In klinischen Studien beim metastasierenden Melanom erzielten die PD-1-spezifischen Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab im direkten Vergleich mit Ipilimumab sowohl eine längere mittlere Überlebensdauer als auch eine höhere Langzeitüberlebensrate. Zudem wurden bei der Blockade von PD-1/PD-L1 weniger und auch schwächere Nebenwirkungen beobachtet, als bei der CTLA-4-Blockade (Schachter et al., 2017; Wolchok et al., 2017). Neben den bisher am besten charakterisierten *Immune Checkpoints* CTLA-4 und PD-1/PD-L1 werden momentan auch weitere Rezeptoren wie zum Beispiel *Lymphocyte activation gene-3* (LAG-3), *T cell immunoglobulin-3* (TIM-3) oder *inducible co-stimulator* (ICOS) als Zielstrukturen neuer *Immune Checkpoint*-Inhibitoren untersucht (Pardoll, 2012b).

Trotz der erstaunlichen Erfolge, die mit den *Immune Checkpoint*-Inhibitoren erzielt wurden, sind dennoch mehrere Faktoren bei der *Immune Checkpoint*-Blockade zu beachten. Erstens, die Rezeptoren und Liganden der *Immune Checkpoints* werden zum Teil auch auf den zu aktivierenden Immunzellen exprimiert. Aus diesem Grund ist es in Abhängigkeit von der gewählten Zielstruktur wichtig, dass die *Immune Checkpoint*-Inhibitoren neben der Blockierung der Ligand-Rezeptor-Interaktion keine weiteren Effektorfunktionen wie ADCC oder CDC auslösen, die zur Depletion der Effektorzellen führen könnten. Um die Depletion von T-Zellen zu verhindern, wurden zum Beispiel die zwei zugelassenen, PD-1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren, Pembrolizumab und Nivolumab, im IgG4-Antikörperformat entwickelt. Humane Antikörper der IgG-Subklasse IgG4 lösen von Natur aus kaum ADCC und CDC aus (Davies und Sutton, 2015). Zwei der zugelassenen PD-L1-Antikörper, Atezolizumab (Genentech/Roche) und Durvalumab (AstraZeneca), weisen genetisch modifizierte IgG1 Fc-Domänen

auf, um die Induktion von ADCC und CDC zu vermeiden. In der C_H2-Domäne von Atezolizumab wurde durch einen Aminosäureaustausch (Asparagin zu Alanin an Position 298) eine N-Glykosylierung entfernt, welche für die Bindung an Fcγ-Rezeptoren essentiell ist (Herbst et al., 2014; Sazinsky et al., 2008). Die Fc-Domäne von Durvalumab enthält drei Punktmutationen, welche ebenfalls die Bindung von Komplementproteinen und Fcγ-Rezeptoren reduzieren (Stewart et al., 2015). Ein weiterer Punkt, der bedacht werden sollte, sind die Nebenwirkungen, die durch die unspezifische Stimulation des Immunsystems ausgelöst werden können. *Immune Checkpoint*-Inhibitoren können zum Teil schwerwiegende bis lebensbedrohliche, immunbedingte Nebenwirkungen (engl. *immune-related adverse events*, irAEs) auslösen, wie zum Beispiel schwere Entzündungen des Darms, der Lunge, des Gehirns und auch des Herzmuskels, welche oftmals den Abbruch der Behandlung erzwingen (Palmieri und Carlini, 2018). Die meisten irAEs ähneln Autoimmunerkrankungen und müssen mit immunsuppressiven Kortikosteroiden behandelt werden. Durch den Einsatz von Kortikosteroiden wird wiederum die Effektivität der *Immune Checkpoint*-Inhibitoren beeinträchtigt. Die Blockade von CTLA-4 löst häufiger und stärkere irAEs aus als PD-1- oder PD-L1-spezifische *Immune Checkpoint*-Inhibitoren (Puzanov et al., 2017). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den bisher publizierten Daten von *Knockout*-Mäusen. Während der *Knockout* von *Ctla4* zu schwerwiegenden bis letalen Autoimmunreaktionen führt, zeigen *Pd1-Knockout*-Mäuse einen relativ milden Phänotyp (Nishimura et al., 1998; Waterhouse et al., 1995). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Behandlung mit *Immune Checkpoint*-Inhibitoren ist ihre geringe Ansprechrate. Während in einigen Tumorpatienten eine hohe Wirksamkeit der Therapie beobachtet wurde, zeigte die Behandlung in einem größeren Teil der Patienten keine Wirkung. Gründe dafür sind unter anderem die fehlende Immunogenität mancher Tumoren, oder auch die inhibierende Tumormikroumgebung (Bai et al., 2017). Daher sind Kombinationstherapien mit mehreren *Immune Checkpoint*-Inhibitoren oder mit anderen Immuntherapeutischen Ansätzen, wie zum Beispiel Tumorvakzinen oder immunmodulierenden Zytokinen, sinnvoll. Dieser Wechsel von der *Immune Checkpoint*-Blockade als Monotherapie hin zu Kombinationstherapien ist bereits in vielen aktuellen klinischen Studien zu beobachten. Mehrere hundert klinische Studien zu *Immune Checkpoint*-Inhibitor-Kombinationstherapien sind derzeit aktiv (Assi et al., 2018).

1.2.3. Krebsimmuntherapien mit Zytokinen und Immunzytotoxinen

Zytokine regulieren unter anderem die Aktivierung, die Differenzierung, die Proliferation sowie das Überleben von Immunzellen. Dadurch sind sie prinzipiell für den Einsatz in Immuntherapien geeignet, um Zellen des körpereigenen Immunsystems zu einer Antitumorreaktion zu stimulieren. Die ersten von der FDA zugelassenen Zytokin-Therapien waren 1986 Interferon-alpha ($\text{IFN}\alpha$) für die Behandlung von Haarzellleukämie und 1992 IL-2 für die Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms. Inzwischen wurden noch sechs weitere Zytokine für Immuntherapien zugelassen ($\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, IL-11, *granulocyte colony-stimulating factor* G-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* GM-CSF und *tumor necrosis factor alpha* $\text{TNF}\alpha$). Weitere werden in klinischen Studien untersucht (IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, CD40L und *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* TRAIL) (Young et al., 2014).

IL-2 gehört zur Familie der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten-Zytokine (engl. *common gamma chain receptor*) und wurde zum ersten Mal 1976 als autokriner Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten beschrieben (Morgan et al., 1976). Im Menschen wird IL-2 hauptsächlich von aktivierten CD4^+ T-Zellen, aber auch von CD8^+ T-Zellen und DCs sekretiert (Arenas-Ramirez et al., 2015; Rosenberg, 2014). IL-2 wirkt auf viele Immunzellpopulationen stimulierend, es induziert unter anderem die Expansion und Differenzierung von CD4^+ T-Zellen, steigert die Proliferation und aktiviert CD8^+ T-Zellen und NK-Zellen (Jiang et al., 2016). Die Signalvermittlung von IL-2 erfolgt mittels eines komplexen Rezeptorsystems aus drei verschiedenen Untereinheiten IL-2 $\text{R}\alpha$, IL-2 $\text{R}\beta$ und IL-2 $\text{R}\gamma$. Die Rezeptorketten IL-2 $\text{R}\gamma$ und IL-2 $\text{R}\beta$ werden konstitutiv auf T- und NK-Zellen exprimiert und bilden zusammen den heterodimeren *intermediate-affinity*-Rezeptor, welcher mit mittlerer Bindungsstärke sowohl IL-2 als auch IL-15 bindet. IL-2 $\text{R}\alpha$ (CD25) wird konstitutiv auf T_{Reg} -Zellen und nach Aktivierung auch auf anderen T-Zellpopulationen und NK-Zellen exprimiert. Als Monomer bindet IL-2 $\text{R}\alpha$ nur mit geringer Affinität IL-2. Zusammen mit IL-2 $\text{R}\gamma$ und IL-2 $\text{R}\beta$ bildet IL-2 $\text{R}\alpha$ jedoch den heterotrimeren IL-2-*high-affinity*-Rezeptor, welcher mit einer vielfach höheren Affinität IL-2 aber nicht IL-15 bindet (Stauber et al., 2006). Aufgrund seiner lymphoproliferativen und stimulatorischen Eigenschaften wurde IL-2 nur wenige Jahre nach seiner Charakterisierung für den Einsatz in Krebsimmuntherapien untersucht. Die systemische Injektion von hochdosiertem IL-2 war eine der ersten zugelassenen Zytokin-Immuntherapien und bewirkte sowohl bei fortgeschrittenen Melanomen als auch bei Nierenkrebs langanhaltende Vollremissionen (Lotze et al., 1986; Rosenberg, 2014). Schwerwiegende Nebenwirkungen, wie das Kapillarlecksyndrom, limitieren allerdings die klinische Anwendung von systemisch injiziertem IL-2. Weitere Hürden bei der Zytokin-Therapie mit IL-2 sind die kurze Serum-Halbwertszeit des Zytokins (nur wenige Minuten im Menschen) und die Stimulation von

immunsuppressiven T_{Reg}-Zellen, welche die tumorspezifischen T-Effektorzellen hemmen können (Ahmadzadeh und Rosenberg, 2006; Lotze et al., 1985). Die anhaltende Stimulation mit hochdosiertem IL-2 kann weiterhin den Aktivierungs-induzierten Zelltod (engl. *activation-induced cell death*, AICD) in CD8⁺ T-Effektorzellen auslösen, wodurch die Antitumorreaktion ebenfalls beeinträchtigt wird (Zou und Chen, 2008).

Als Alternative zur Zytokin-Therapie mit IL-2 wurde IL-15, ein weiteres Zytokin der gamma-Rezeptorketten-Familie, untersucht. IL-15 weist viele Gemeinsamkeiten mit IL-2 auf, es bindet mit IL-2R β und IL-2R γ den gleichen *intermediate-affinity*-Rezeptor und induziert ähnliche Signalwege. Beide Zytokine aktivieren jeweils den Transkriptionsfaktor STAT5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*) und induzieren die PI3K/Akt- und MAPKinase-Signalwege. IL-15 stimuliert mit T-Effektorzellen, NK-Zellen und B-Zellen auch weitgehend gleiche Immunzellpopulationen wie IL-2 (Sim und Radvanyi, 2014). Im Gegensatz zu IL-2 induziert IL-15 jedoch vermehrt die Differenzierung von T-Gedächtniszellen und stimuliert keine immunsuppressiven T_{Reg}-Zellen (Waldmann et al., 2001). Außerdem löst IL-15 in CD8⁺ T-Zellen keinen AICD aus, sondern inhibiert durch Induktion einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xl sogar den IL-2-induzierten AICD (Marks-Konczalik et al., 2000; Mueller et al., 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen IL-2 und IL-15 ist, dass IL-15 kaum in löslicher Form sekretiert wird, sondern zumeist assoziiert mit der IL-15-Rezeptor alpha-Kette (IL-15R α) auf der Membran von Immunzellen vorliegt (Burkett et al., 2004). Dort wird der IL-15/IL-15R α -Komplex für andere Immunzellen transpräsentiert, um zusammen mit IL-2R β und IL-2R γ den IL-15-*high-affinity*-Rezeptor zu bilden. Wird die IL-15R α -Rezeptorkette durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgeschnitten, kann der lösliche IL-15R α -Rezeptor (engl. *soluble IL-15R α* , sIL-15R α) als IL-15-Antagonist wirken (Mortier et al., 2008). Interessanterweise fungiert ein Komplex aus IL-15 mit einem verkürzten Teil der sIL-15R α Kette jedoch als IL-15-Agonist (Mortier et al., 2004; Mortier et al., 2006). Mortier et al. entwickelten ein rekombinantes Einzelkettenformat dieses IL-15-Agonisten, in welchem IL-15 über einen GS-Linker an die Sushi-Domäne des IL-15R α (Aminosäuren 31-107) gekoppelt ist. Durch die Fusion an das IL-15R α ₃₁₋₁₀₇-Fragment wird die Affinität von IL-15 für den *intermediate-affinity*-Rezeptor signifikant erhöht, während die Bindung an den IL-15-*high-affinity*-Rezeptor nicht behindert wird (Mortier et al., 2006). Zusätzlich wird durch die Fusion an das IL-15R α ₃₁₋₁₀₇-Fragment die Expression von IL-15 erhöht und die Stabilität des Zytokins gesteigert (Bergamaschi et al., 2008). In murinen Melanom-Modellen reduzierte das IL-15/IL-15R α ₃₁₋₁₀₇-Fusionsprotein im Vergleich zu IL-15 die Metastasenbildung effektiver und verlängerte das Überleben (Bessard et al., 2009). IL-15 und rekombinante Formate von IL-15 werden momentan in verschiedenen klinischen Studien, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit adoptiver Immunzelltherapie, untersucht (Robinson und Schluns, 2017).

Interleukin-12 (IL-12) ist ein weiteres Zytokin, das in klinischen Studien für die Krebsimmuntherapie untersucht wird und von Bedeutung für diese Arbeit ist. IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin und gilt als wichtiges Verbindungselement zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Es wird hauptsächlich von APCs, wie DCs, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen nach der Aktivierung durch *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) sekretiert und aktiviert T- und NK-Zellen (Tugues et al., 2015). IL-12 stimuliert zudem die Differenzierung von Typ 1 T-Helferzellen und T-Gedächtniszellen und kann durch die Inhibition der Angiogenese das Tumorstadium hemmen (Chowdhury et al., 2011; Gerber et al., 2003; Manetti et al., 1993). Eine Besonderheit von IL-12 ist dessen molekularer Aufbau. IL-12 bildet mit IL-23, IL-27 und IL-35 die einzige Zytokinfamilie, die aus Heterodimeren besteht (Vignali und Kuchroo, 2012). Diese Heterodimerstruktur erschwerte zunächst die Herstellung von rekombinantem IL-12, da die beiden Untereinheiten separat exprimiert und anschließend in den Zellen korrekt assoziieren müssen. Erst durch die Entwicklung eines Einzelkettenformats von IL-12 (engl. *single chain IL-12*, scIL-12) wurde die Dimerisierung der Proteinuntereinheiten und somit auch die Produktion vereinfacht (Lieschke et al., 1997). Während IL-12 in präklinischen *in vivo* Modellen durch die Aktivierung von T- und NK-Zellen effektiv die Regression des Tumors induzieren und das Überleben verlängern konnte, beschränkten sich die Erfolge von IL-12 in klinischen Studien auf hämatologische Malignitäten (Brunda et al., 1993). Bei hämatologischen Krebsarten, wie zum Beispiel Non-Hodgkin-Lymphomen, erzielte die subkutane Injektion von IL-12 in bis zu 20 % der Patienten eine Vollremission und bei etwa 50 % der Patienten ein stabiles Krankheitsbild (Younes et al., 2004). Bei soliden Tumoren hingegen, führte selbst die maximal tolerierbare Dosis von IL-12 nur in einzelnen Fällen zu partiellen oder kompletten Remissionen (Atkins et al., 1997; Lacy et al., 2009).

Trotz ihres immunstimulatorischen Potenzials sind die bisher untersuchten Zytokin-Therapien nur eingeschränkt für die klinische Anwendung einsetzbar. Gründe hierfür sind jeweils die geringen Serum-Halbwertszeiten der Zytokine, sowie die systemische Toxizität, die bei der Injektion von höheren Zytokin-Dosen auftritt (Kontermann, 2012). Um die Therapie mit Zytokinen zu optimieren, wurde versucht, die Serum-Halbwertszeit zu erhöhen und die Pharmakokinetik der Moleküle durch einen zielgerichteten Transport und die Anreicherung am Tumor zu verbessern (Kontermann, 2012). Zu diesem Zweck wurden verschiedene rekombinante Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine entwickelt. Die Zytokindomäne kann dabei entweder an ganze Antikörper-Moleküle, an Antigen-bindende Fab- und scFv-Antikörperfragmente, oder auch an die Fc-Domäne eines Antikörpers (Fc-Zytokine) fusioniert werden (Abbildung 1.2). Durch die Fusion an eine Fc-Domäne wird die Serum-Halbwertszeit eines Zytokins signifikant verlängert. Verantwortlich für die erhöhte Serum-Halbwertszeit ist unter anderem der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn), welcher durch Endozytose aufgenommene Antikörper an der

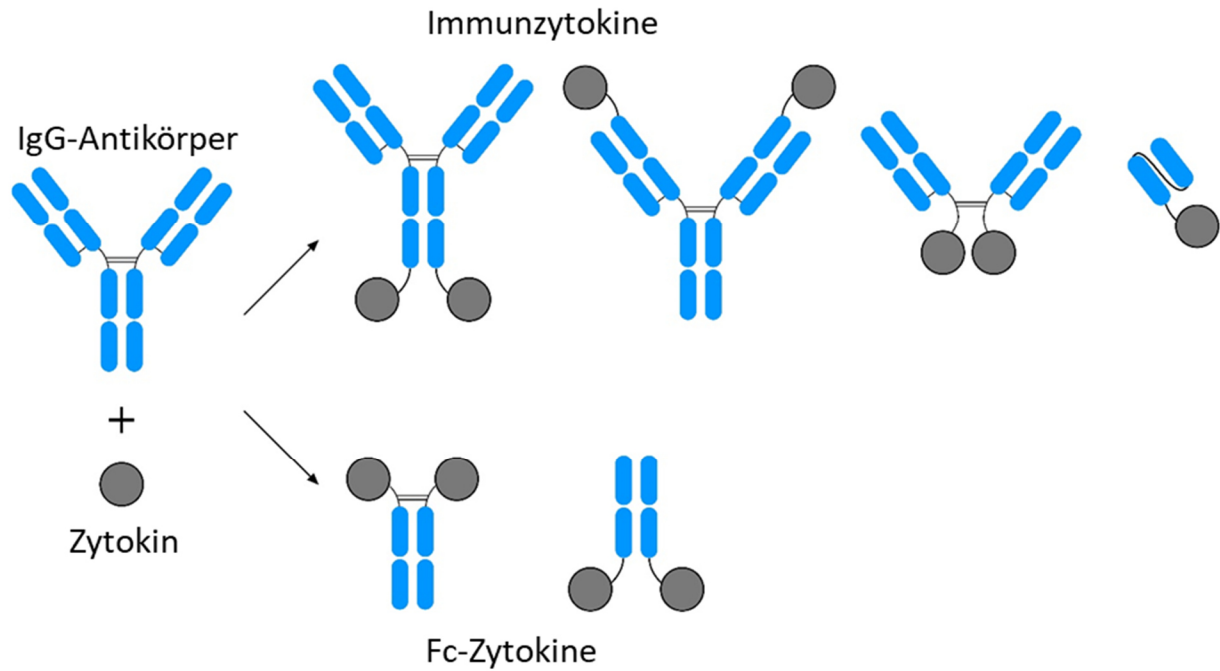


Abbildung 1.2: **Schematische Darstellung von Antikörper-Zytokin-Fusionsproteinen.** Immunzytokine und Fc-Zytokine stellen eine Gruppe strukturell hochvariabler rekombinanter Proteine dar, welche durch die Fusion von Zytokin- und Antikörpermolekülen beziehungsweise Antikörperfragmenten generiert werden. Fc-Zytokine bestehen jeweils aus einem Zytokin, welches an den C- oder N-Terminus eines IgG Fc-Teils gekoppelt wurde. Aufgrund des FcRn-vermittelten Antikörper-Recyclings weisen Fc-Zytokine eine erhöhte Serum-Halbwertszeit auf. Immunzytokine werden durch die Fusion eines Zytokins an vollständige IgG-Moleküle oder an antigenbindende Antikörperfragmente wie Fab- oder scFv-Antikörperfragmente generiert. Immunzytokine können durch die enthaltene Antikörperdomäne gezielt an einen Wirkort transportiert werden, wodurch sie im Vergleich zu Zytokinen eine verbesserte Pharmakokinetik aufweisen und die systemische Toxizität reduziert wird.

Fc-Domäne bindet und diese wieder aus der Zelle transportiert, bevor sie in Lysosomen abgebaut werden (siehe Kapitel 1.2.1). Außerdem werden Fc-Zytokine durch ihre Molekülgröße langsamer durch die Niere ausgeschieden als die entsprechenden niedermolekularen Zytokine (Czajkowsky et al., 2012; Kontermann, 2011). Ein Beispiel für ein Fc-Zytokin ist ALT-803 (Altor BioScience), ein Fusionsprotein aus einer IgG1 Fc-Domäne gekoppelt an einen IL-15-Superagonisten. Der in ALT-803 enthaltene IL-15-Superagonist ähnelt im Aufbau dem bereits beschriebenen, von Mortier et al. generierten IL-15/IL15R α_{31-107} -Fusionsprotein. ALT-803 nutzt eine IL-15-Mutante (N72D), welche über einen GS-Linker an die Sushi-Domäne des IL-15R α fusioniert wurde. Durch den Aminosäureaustausch in der IL-15-Mutante (Asparagin zu Asparaginsäure an der Aminosäureposition 72) wird die Bindung an den *intermediate-affinity*-Rezeptor erhöht, wodurch die biologische Aktivität von IL-15 noch einmal um das Vier- bis Fünffache gesteigert wird (Zhu et al., 2009). In präklinischen Modellen zeigte ALT-803 sowohl eine verlängerte Serum-Halbwertszeit als auch eine gesteigerte antitumorale Wirkung im Vergleich zu rekombinantem IL-15 (Han et al., 2011; Rhode et al., 2016; Xu et al., 2013). In klinischen Studien wird ALT-803 momentan unter anderem bei Patienten mit rezidivierten/refraktären Leukämien und

Lymphomen untersucht (Romee et al., 2018). Fusionsproteine bestehend aus Zytokinen und Antikörpern oder Antigen-bindenden Antikörperfragmenten, wie Fab- und scFv-Fragmenten, werden auch als Immunzytokine bezeichnet. Immunzytokine können durch die Antikörperbindung an ein tumorassoziiertes Antigen am Wirkort angereichert werden. Dadurch verbessert sich zum einen die Pharmakokinetik des Moleküls, zum anderen wird auch die systemische Toxizität der Zytokine reduziert (Kontermann, 2012). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Immunzytokine eine ähnliche Funktion wie bispezifische Antikörper aufweisen können und die Konjugation von Tumor- mit Effektorzellen fördern (Buhtoiarov et al., 2011). So induzierte zum Beispiel das Immunzytokin Hu14.18-IL2, bestehend aus IL-2 und einem humanisierten Antikörper gegen das Disialogangliosid GD2, in präklinischen Studien eine stärkere Lyse von GD2-positiven Tumorzellen und rekrutierte NK-Zellen effizienter an den Tumor als eine Kombination aus demselben GD2-Antikörper und IL-2 (Buhtoiarov et al., 2011). In einer klinischen Phase-I Studie induzierte Hu14.18-IL2 in mehreren Patienten mit rezidierten/refraktären Neuroblastom eine über mehrere Monate anhaltende, vollständige Remission des Tumors (Shusterman et al., 2010). In weiteren klinischen Phase-II Studien wird der Nutzen von Hu14.18-IL-2 auch zur Behandlung von Melanomen untersucht (Albertini et al., 2012). Daneben werden zurzeit sechs weitere IL-2-enthaltende Immunzytokine und ähnliche Moleküle, die auf IL-12 oder TNF α basieren, in klinischen Studien eingesetzt (Neri und Sondel, 2016).

1.2.4. Zelluläre Immuntherapien für die Krebs-Behandlung

Unter dem Begriff der zellulären Immuntherapien werden verschiedene Behandlungsansätze zusammengefasst, die darauf basieren lebende, tumorreaktive Immunzellpopulationen zu injizieren, um in Patienten Antitumorreaktionen zu induzieren. Hierbei kann zwischen dem adoptiven Transfer von autologen Lymphozyten, dem Transfer von genetisch modifizierten Immunzellen und dem adoptiven Transfer von allogenen Immunzellpopulationen unterschieden werden (June et al., 2015; Rohaan et al., 2019). Da die injizierten Immunzellen im Patienten weiterhin voll funktional sind, expandieren und über lange Zeiträume - zum Teil über Jahre - persistieren können, werden zelluläre Immuntherapeutika auch als „lebende“ Medikamente (engl. *living drugs*) bezeichnet.

Immuntherapien mit autologen Immunzellen

Die ersten zellulären Immuntherapien wurden Ende des 20. Jahrhunderts mit autologen Immunzellen entwickelt. Rosenberg et al. isolierten Lymphozyten von Krebspatienten und expandierten diese *ex vivo* durch die Stimulation mit IL-2. Anschließend wurden große Mengen dieser aktivierten Immunzellen in die Patienten intravenös re-injiziert, gefolgt von systemischen Gaben von IL-2 (Grimm et al., 1982; Muul et al., 1987). Die therapeutische Wirksamkeit dieser autologen Immunzelltherapien war jedoch variabel und maßgeblich von der Quelle der Lymphozyten abhängig. So wiesen Lymphozytenpopulationen, welche aus dem peripheren Blut isoliert und mit IL-2 expandiert wurden, sogenannte *lymphokine-activated killer cells* (LAK-Zellen), nur eine geringe antitumorale Wirkung auf. Tatsächlich konnte 1993 in einer klinischen Studie aufgezeigt werden, dass die erzielten Effekte der LAK-Zelltherapien zum großen Teil auf die systemische Gabe von IL-2 zurückzuführen waren (Rosenberg et al., 1993). Lymphozyten, die aus Tumorgewebe isoliert wurden, sogenannte *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs), induzierten hingegen in Patienten mit metastasierenden Melanomen zum Teil langanhaltende, komplette Remissionen (Andersen et al., 2016; Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 2011). Der adoptive Transfer von heterogenen, hauptsächlich aus T- und NK-Zellen bestehenden TILs wird noch heute unter anderem bei metastasierenden Melanomen angewendet und erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten (Rosenberg und Restifo, 2015). Zuerst werden TILs aus Tumorsektanten isoliert und einem Expansionsprotokoll unterzogen. Anschließend werden die Patienten für die Infusion der TILs vorbereitet, indem mittels verschiedener nicht-myeloablativer Zytostatika, wie zum Beispiel Cyclophosphamid und Fludarabin, die endogenen Lymphozyten der Patienten temporär entfernt werden. Die Depletion der endogenen Lymphozyten induziert den

Anstieg verschiedener T-Zellwachstums-fördernder Zytokine wie IL-15 im Serum der Patienten, wodurch die Persistenz und die klinische Wirkung der anschließend verabreichten TILs deutlich gesteigert wird (Dudley et al., 2002; Dudley et al., 2008; Gattinoni et al., 2005). Schließlich werden die expandierten Immunzellen zusammen mit hohen systemischen Dosen an IL-2 dem Patienten verabreicht. Während in den nachfolgenden Tagen die TILs anwachsen und eine Antitumorreaktion etablieren, rekonstituiert sich auch das endogene Immunsystem innerhalb weniger Tage komplett (Rosenberg und Restifo, 2015).

Immuntherapien mit genetisch modifizierten Immunzellen

Nach der Entwicklung dieser ersten autologen Immunzelltherapien wurde schnell erkannt, dass ihr therapeutischer Erfolg zumeist durch eine zu geringe Tumorreaktivität der injizierten Immunzellen limitiert wird. Ein Ansatz, die Tumorspezifität der Lymphozyten zu erhöhen, ist die genetische Modifikation mit transgenen T-Zellrezeptoren (engl. *T-cell receptor*, TCR). Durch die Klonierung und Sequenzierung von tumorspezifischen TCRs ist es möglich, aus dem peripheren Blut isolierte T-Zellen mit Tumorantigen-spezifischen TCRs auszurüsten und anschließend für die Induktion einer Antitumorreaktion zu verabreichen. Die klinische Anwendbarkeit solcher TCR-modifizierter T-Zellen wurde zum ersten Mal im Jahr 2006 gezeigt. T-Zellen, welche mit einem transgenen MART-1 (engl. *melanoma antigen recognized by T cells*)-spezifischen TCR ausgerüstet wurden, erzielten in einer klinischen Studie mit Melanom-Patienten partielle Remissionen und waren bis zu einem Jahr nach dem adoptiven Transfer noch im peripheren Blut der Patienten nachweisbar (Johnson et al., 2009). Seitdem wurden viele weitere TCRs gerichtet gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene wie gp100 oder auch NY-ESO-1 isoliert und zur Behandlung mit TCR-modifizierten T-Zellen in klinischen Studien eingesetzt. (Kochenderfer et al., 2010; Met et al., 2019). Aufgrund der im Thymus stattfindenden Negativselektion von selbstreaktiven T-Zellen während der T-Zell-Entwicklung, weisen die aus Patienten isolierten TCRs ohne weitere Modifikationen allerdings zumeist nur eine geringe Bindungsaffinität auf (Met et al., 2019). Außerdem sind TCRs auf die Präsentation von Antigenen im Komplex mit MHC-Molekülen angewiesen. Um diese Restriktionen der TCRs zu überwinden, wurden chimäre Antigenrezeptoren (engl. *chimeric antigen receptor*, CAR) entwickelt. CARs sind rekombinante Transmembranproteine, die mittels einer extrazellulären scFv-Antikörperdomäne MHC-unabhängig an beliebige Zielstrukturen wie Peptide, Lipide oder auch Kohlenhydratketten auf der Oberfläche von Tumorzellen binden können. Die extrazelluläre Antikörperdomäne der CARs ist über eine bewegliche *hinge*-Region, die meist von CD8 α oder IgG1 abgeleitet ist, und eine Transmembrandomäne mit

CAR-Konstrukte der:

1. Generation 2. Generation 3. Generation 4. Generation

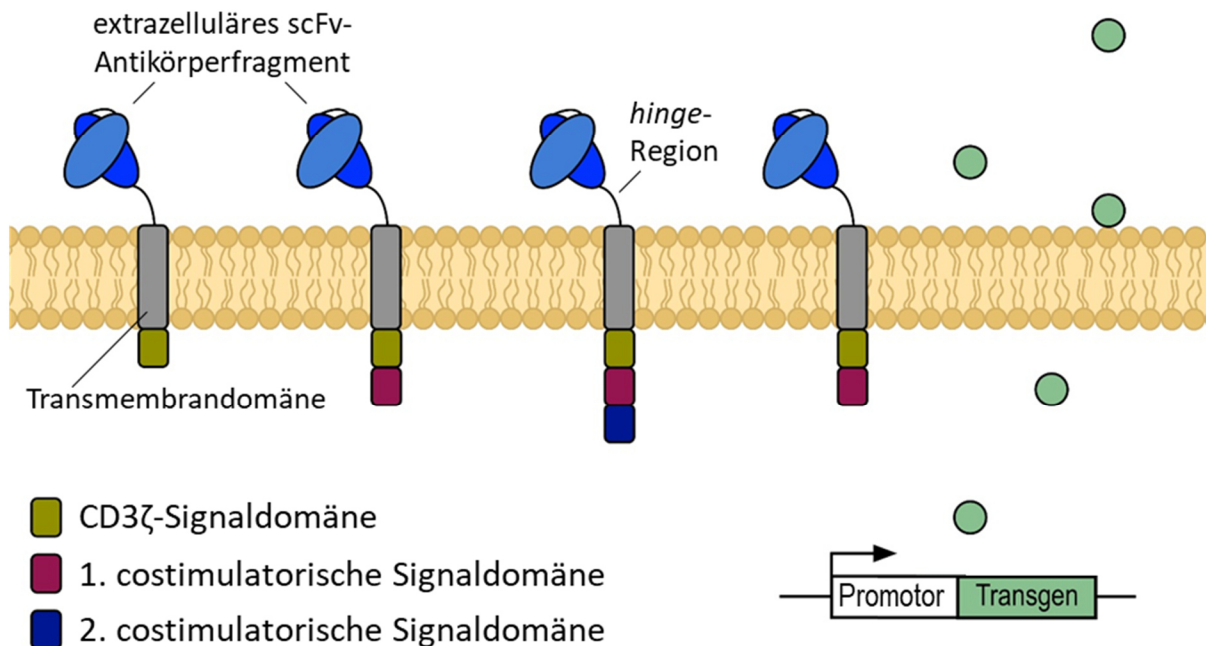


Abbildung 1.3.: **Schematische Darstellung des Aufbaus chimärer Antigenrezeptoren.** CARs der 1. Generation bestehen aus einer extrazellulären scFv-Antikörperdomäne, welche über eine flexible *hinge*-Region und eine Transmembrandomäne an eine intrazelluläre CD3ζ-Signaldomäne gekoppelt ist. CARs der 2. Generation enthalten neben der CD3ζ-Signaldomäne noch eine weitere intrazelluläre Signaldomäne abgeleitet von costimulatorischen Rezeptoren wie CD28, 4-1BB, OX40, ICOS oder CD27. CARs der 3. Generation enthalten zwei oder mehrere verschiedene costimulatorische Signaldomänen. Durch die Auswahl der verschiedenen costimulatorischen Signaldomänen ist es möglich, unterschiedliche Eigenschaften der CAR-Effektorzellen wie zum Beispiel die Tumorreaktivität, die Persistenz oder auch die Expansionsrate zu optimieren. CAR-Effektorzellen der 4. Generation exprimieren neben dem CAR-Konstrukt noch weitere Transgene wie zum Beispiel Zytokine, Antikörper oder Liganden, welche immunstimulatorische Effekte auf umgebende Nachbarzellen ausüben aber auch autokrin auf die CAR-Effektorzellen selbst wirken können.

verschiedenen intrazellulären Signaldomänen verbunden, welche nach der Bindung des Antigens aktivierende Signalwege in den Lymphozyten induzieren (Abbildung 1.3) (Brudno und Kochenderfer, 2018). Die Transmembrandomäne der CARs ist zum Großteil von T-Zellproteinen wie CD3ζ, CD4, CD8 oder CD28 abgeleitet. Die anfänglich hergestellten CARs, CARs der 1. Generation, enthielten nur eine einzelne Signaldomäne abgeleitet von der CD3ζ-Kette des TCRs oder der γ-Kette des FcγRIIIA-Rezeptors (Abbildung 1.3) (Eshhar et al., 1993). CAR T-Zellen der 1. Generation waren zwar *in vitro* und in *in vivo* Modellen dazu in der Lage, Tumorzellen zu lysieren, im Menschen vermittelten sie jedoch nur geringe therapeutische Effekte (Eshhar et al., 1993; Kershaw et al., 2006; Park et al., 2007). CARs der 2. Generation enthalten neben der CD3ζ-Signaldomäne zusätzlich eine zweite Signaldomäne abgeleitet von costimulatorischen Rezeptoren der CD28- oder TNFR-Familie wie CD28, ICOS, 4-1BB, OX40 oder auch CD27. Je nach enthaltener costimulatorischer Signaldomäne weisen CAR T-Zellen der

2. Generation eine verbesserte Tumorreaktivität und Expansionsrate, eine verlängerte *in vivo* Persistenz, oder auch eine erhöhte Zytokinsekretion auf als vergleichbare CAR T-Zellen der 1. Generation (Imai et al., 2004; June et al., 2018; Loskog et al., 2006; Milone et al., 2009; Savoldo et al., 2011). CARs der 3. Generation enthalten zusätzlich zu CD3 ζ zwei oder mehrere verschiedene costimulatorische Signaldomänen (Abbildung 1.3). Obwohl CAR T-Zellen der 3. Generation *in vitro* und *in vivo* zum Teil vorteilhaftere Aktivierungsprofile aufweisen, wurden in klinischen Studien zumeist keine Behandlungsvorteile gegenüber CAR T-Zellen der 2. Generation erzielt (Carpenito et al., 2009; Enblad et al., 2018; Till et al., 2012; Zhong et al., 2010). Außerdem wurden CARs der 3. Generation zum Teil mit einer Hyperstimulation und dem aktivierungsinduzierten Zelltod (engl. *activation-induced cell death*, AICD) der generierten CAR-Effektorzellen in Verbindung gebracht (Hombach et al., 2013). Neben der Optimierung des CAR-Designs und der Ermittlung der idealen Kombinationen von intrazellulären Signaldomänen werden momentan noch weitere Ansätze verfolgt, um CAR-Therapien zu verbessern. Die zumeist angestrebten Ziele bei der Weiterentwicklung der CARs beinhalten die Erweiterung des Antigen-Repertoires, die Verbesserung des Sicherheitsprofils und die Aufrüstung der CAR-Zellen mit zusätzlichen Effektorfunktionen.

Große Hürden bei der Behandlung mit CAR-modifizierten Immunzellen sind die heterogene Antigenexpression innerhalb von Tumoren, sowie der mögliche Verlust des Zielantigens im Lauf der CAR-Therapie. So wird bei der klinischen Anwendung von CD19-spezifischen CAR T-Zellen nach einem anfänglichen Behandlungserfolg oft das Auswachsen eines Antigen-negativen Rezidivs beobachtet (Fry et al., 2018; Maude et al., 2014; Viapiano et al., 2017). Um den *tumor immune escape* durch Antigenverlust während der CAR-Therapie zu verhindern, wurde mit verschiedenen Ansätzen versucht, das Antigen-Repertoire der CAR-Effektorzellen zu erweitern (Abbildung 1.4, A). Dies wurde unter anderem durch die Expression von mehreren unterschiedlichen CAR-Konstrukten innerhalb einer Effektorzelle oder auch von multispezifischen Tandem CARs erreicht (De Munter et al., 2018; Grada et al., 2013; Hegde et al., 2016; Ruella et al., 2016). Tandem CARs kombinieren zwei unterschiedliche extrazelluläre scFv-Antikörperfragmente innerhalb eines einzelnen CAR-Konstrukts. Der Vorteil von Tandem CARs gegenüber mehreren einzelnen CARs ist die insgesamt geringere Größe des in die Zelle einzubringenden Konstrukts. Nachteilig ist die aufwändigere Konstruktion der Tandem CARs, um die gleichzeitige Bindung der verschiedenen Antigene und die Aktivierung der CAR-Effektorzellen auch nach Bindung eines einzelnen Antigens zu ermöglichen (Grada et al., 2013; Martyniszyn et al., 2017). Eine weitere Neuerung in der CAR-Therapie war die Entwicklung von universellen oder auch *switchable* CARs, welche mithilfe verschiedener Adaptermoleküle multiple Antigene und Tumorentitäten erkennen können. Die universellen CAR-Konstrukte binden spezifisch an Antigene, die entweder körperfremd sind (wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat, FITC) oder unter normalen physiologischen Bedingungen nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dadurch sind die

universellen CAR-Effektorzellen allein zunächst nicht funktional. Erst in der Kombination mit Tumorantigen-spezifischen Antikörpern, die als *Tag* das CAR-Antigen enthalten und als Adaptermolekül wirken, werden die CAR-Zellen gegen den Tumor gerichtet und aktiviert (Cartellieri et al., 2016; Ma et al., 2016; Rodgers et al., 2016). Da die Adaptermoleküle nur eine geringe Serum-Halbwertszeit von wenigen Stunden bis Tagen aufweisen und für die Therapie regelmäßig verabreicht werden müssen, ermöglichen universelle CARs nicht nur ein größeres und flexibleres Antigen-Repertoire, sondern weisen auch einen zusätzlichen Sicherheitsaspekt auf (Bachmann, 2019). So kann bei schwerwiegenden Nebenwirkungen die Injektion der Adaptermoleküle eingestellt werden, um die CAR-Effektorzellen wieder zu inaktivieren.

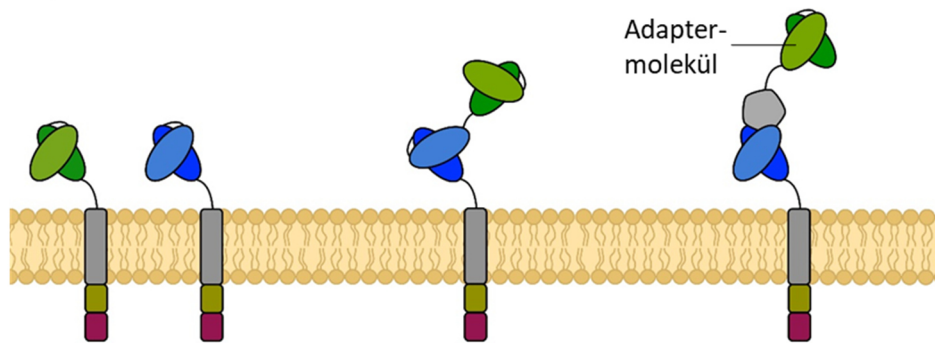
Weitere Strategien für die Verbesserung des Sicherheitsprofil von CAR-Therapien beinhalten unter anderem die Expression von Suizid-Genen, die Verwendung von inhibitorischen CARs oder auch die kontrollierte Expression des CAR-Konstrukts (Abbildung 1.4, B) (Guedan et al., 2019). Mithilfe synthetischer, Tumorantigen-spezifischer Notch-Rezeptoren (synNotch) ist es zum Beispiel möglich, die CAR-Expression Antigen-spezifisch zu induzieren (Roybal et al., 2016; Srivastava et al., 2019). SynNotch-Rezeptoren sind chimäre Transmembranproteine bestehend aus einem extrazellulären Antikörperfragment und einem intrazellulären Transkriptionsfaktor, die über eine Notch-Rezeptor abgeleitete Transmembrandomäne miteinander fusioniert wurden (Morsut et al., 2016). Die Transmembrandomäne des synNotch-Rezeptors enthält zwei proteolytische Schnittstellen, welche nach Rezeptorbindung von ADAM-Metalloproteasen und dem Gamma-Sekretase-Komplex sequenziell geschnitten werden. Der Verdau der Notch-Transmembrandomäne führt zur Abspaltung des intrazellulären Transkriptionsfaktors. Der entlassene Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern und leitet dort die Transkription des CARs oder weiterer Transgene ein. Der daraufhin exprimierte CAR bindet spezifisch ein zweites, vom synNotch-Rezeptor verschiedenes tumorassoziiertes Antigen. SynNotch-induzierte CAR-Effektorzellen werden somit erst nach konsekutiver Bindung zweier unterschiedlicher Antigene aktiviert, wodurch eine spezifischere Erkennung von Tumorzellen ermöglicht und das Risiko von *on-target/off-tumor*-Toxizitäten reduziert wird (Roybal et al., 2016; Srivastava et al., 2019). Inhibitorische CARs, auch „iCARs“ genannt, werden in Kombination mit herkömmlichen aktivierenden CARs in Effektorzellen eingebracht und sind in der Lage, Antigen-spezifisch die Aktivierung der CAR-Effektorzellen zu blockieren (Fedorov et al., 2013). iCARs enthalten anstatt aktivierender inhibitorische Signaldomänen, abgeleitet von immunregulatorischen Rezeptoren wie PD-1 oder auch CTLA-4. Die Antigenbindung eines iCARs induziert somit inhibitorische Signalwege, welche ähnlich wie bei der Immunblockade durch PD-1 und CTLA-4 das Signal des aktivierenden CARs neutralisieren und die lytische Aktivität der CAR-Effektorzellen hemmen. Der gleichzeitige Einsatz von iCARs und aktivierenden CARs ermöglicht so eine bessere Kontrolle der Aktivität der CAR-

A Erweiterung des Antigen-Repertoires:

Multiple CAR-Konstrukte

Tandem CAR

Universeller CAR

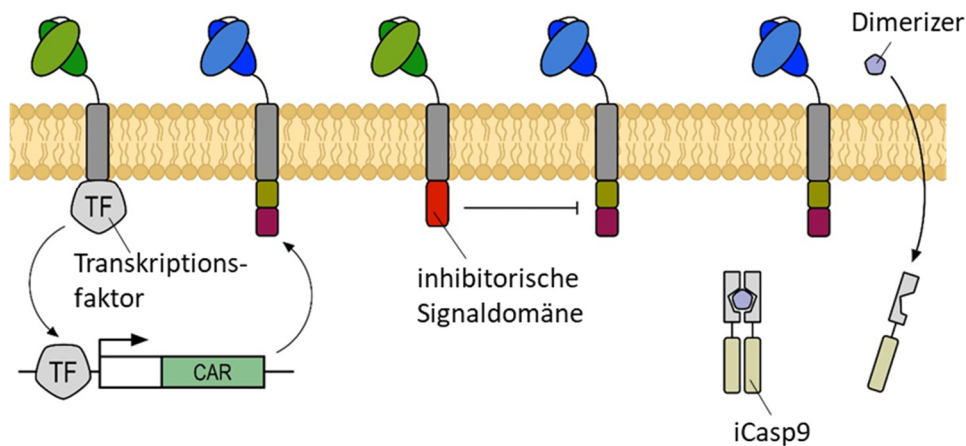


B Verbesserung des Sicherheitsprofils:

SynNotch-induzierter CAR

iCAR

iCasp9



C Erweiterte Effektorfunktionen

Konstitutive Transgen-Expression

Aktivierungs-induzierte Transgen-Expression

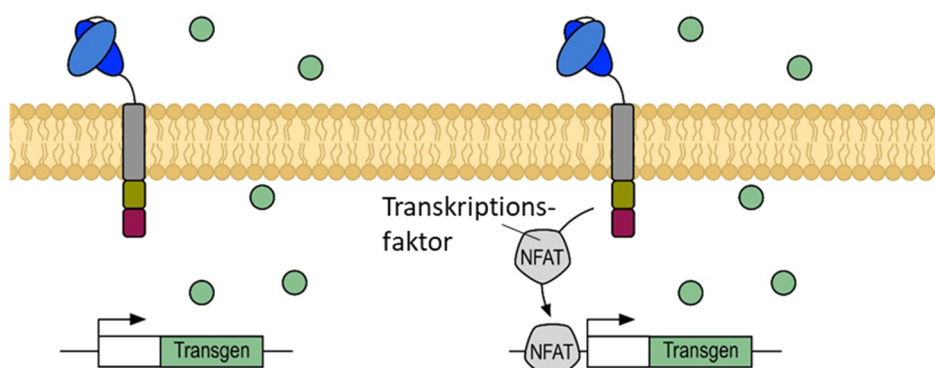


Abbildung 1.4: **Optimierungsstrategien für CAR-Effektorzellen.** **A) Optimierung durch Erweiterung des Antigen-Repertoires:** Das Antigen-Repertoire von CAR-Effektorzellen kann durch die Verwendung von mehreren CAR-Konstrukten, von Tandem CARs mit multiplen scFv-Antikörperdomänen, oder von universellen CARs mit Tumorantigen-spezifischen Adaptermolekülen erweitert werden. **B) Optimierung durch Verbesserung des Sicherheitsprofils:** Mithilfe der synNotch-Rezeptor induzierten CAR-Expression, oder durch die Kombination von inhibitorischen und aktivierenden CAR-Konstrukten kann das Risiko von *on-target/off-tumor*-Toxizitäten reduziert werden. Induzierbare Suizid-Gene wie beispielsweise die induzierbare Caspase-9 (iCasp9) ermöglichen die Depletion der CAR-Effektorzellen im Falle von schwerwiegenden Nebenwirkungen. **C) Optimierung durch Erweiterung der Effektorfunktionen:** CAR-Effektorzellen der 4. Generation exprimieren neben dem CAR zusätzliche Transgene, die das Tumormikromillieu verändern oder Immunzellen stimulieren können. Die Transgene werden entweder konstitutiv oder aktivierungsinduziert, mithilfe eines Transkriptionsfaktor-kontrollierten Promotors, exprimiert. Weitere Erläuterungen im Text.

Effektorzellen, wodurch das Risiko von *on-target/off-tumor*-Toxizitäten reduziert wird (Fedorov et al., 2013). Das Konzept der Suizid-Gene beruht darauf, dass neben dem CAR noch weitere Transgene in die Effektorzelle eingebracht werden, welche bei schwerwiegenden Nebeneffekten oder auch nach abgeschlossener Therapie die Depletion der CAR-Effektorzellen ermöglichen. Hierbei kann zwischen metabolisch induzierten, Dimerisierungs-induzierten und Antikörper-vermittelten Systemen unterschieden werden (Jones et al., 2014). Ein Beispiel für ein klinisch bereits eingesetztes Suizid-Gen ist eine rekombinante, mittels Dimerisierung gezielt induzierbare Form von Caspase-9 (engl. *inducible caspase-9*, iCasp9) (Gargett und Brown, 2014; Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2015). Diese induzierbare Caspase-9 wurde durch Fusion einer trunkierten Caspase-9-Mutante, ohne endogene Caspase Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne, mit einem mutierten Fragment des FKBP12 Proteins (engl. *FK506-binding protein*) generiert. Wird mittels eines niedermolekularen *Dimerizers*, der die FKBP12-Domäne bindet, die Dimerisierung der iCasp9-Moleküle induziert, löst dies zunächst die autokatalytische Spaltung und Aktivierung der rekombinanten iCasp9 und anschließend die Einleitung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs in den CAR-Effektorzellen aus (Di Stasi et al., 2011; Straathof et al., 2005).

Durch das Einbringen von zusätzlichen Transgenen können CAR-Zellen nicht nur mit einem „Sicherheitsschalter“, sondern auch mit weiteren Effektorfunktionen ausgestattet werden, welche die lytische Funktion des CARs komplementieren (Abbildung 1.4, C). Sogenannte *armored* CARs oder auch CARs der 4. Generation exprimieren verschiedene immunstimulatorische Proteine wie Zytokine, proinflammatorische Liganden oder auch Antikörper, mit denen sie das Tumormikromilieu beeinflussen, endogene Immunzellen rekrutieren und diese zu einer Antitumorreaktion stimulieren können. Zusätzlich sind die sekretierten Immunstimulatoren zumeist auch in der Lage, autokrin auf die CAR-Effektorzellen zurückzuwirken und weitere Aktivierungssignale zu induzieren (Petersen und Krenciute, 2019; Yeku und Brentjens, 2016). Suarez und Kollegen entwickelten zum Beispiel CAIX (engl. *carbonic anhydrase IX*)-spezifische CAR T-Zellen der 4. Generation, welche durch die konstitutive Sekretion von antagonistischen PD-L1-spezifischen Antikörpern in einem orthotopen, renalen Karzinommodell sowohl eine größere Anzahl an endogenen NK-Zellen an den Tumor rekrutierten, als auch die Expression von Erschöpfungsmarkern auf CAR T-Zellen und TILs reduzierten (Suarez et al., 2016). Insgesamt kontrollierten anti-PD-L1-sekretierende CAR T-Zellen das Tumorwachstum und verlängerten das Überleben effizienter als vergleichbare CAIX-spezifische CAR T-Zellen, welche einen Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen sekretierten. Mehrfach wurden CAR-Effektorzellen auch mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, IL-15 oder IL-18 ausgestattet (Petersen und Krenciute, 2019). Krenciute et al. generierten IL-15-sekretierende IL13R α 2-spezifische CAR T-Zellen, die auch über längere Zeiträume ohne weitere Zugabe von exogenen Zytokinen ihre Lebensfähigkeit und Zytotoxizität bewahren können (Krenciute et al., 2017). Die IL-15 exprimierenden IL13R α 2-spezifischen

CAR T-Zellen wiesen zudem nach wiederholter Antigenstimulation eine erhöhte Zytokinproduktion und Proliferationsrate auf. Auch in einem orthotopen, xenotransplantierten *in vivo* Glioblastom-Modell persistierten IL-15-sekretierende CAR T-Zellen länger, wodurch das progressionsfreie Überleben und die Gesamtüberlebensrate im Vergleich zur Behandlung mit CAR T-Zellen der 2. Generation signifikant gesteigert wurde (Krenciute et al., 2017). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit einem membranständigen IL-15/IL15 α -Fusionsprotein erzielt. CD19-spezifische CAR T-Zellen persistierten durch die Transpräsentation dieses membranständigen IL-15/IL15 α -Fusionsproteins länger, wiesen einen *memory stem cell*-ähnlichen Phänotyp auf und zeigten in einem xenotransplantierten Lymphommodell eine höhere Antitumoraktivität als CAR T-Zellen der 2. Generation (Hurton et al., 2016). Durch die Sekretion von IL-12 kann die Antitumoraktivität von T-Zell-basierten zellulären Immuntherapien ebenfalls gesteigert werden. IL-12 exprimierende T-Zellen weisen nach Antigenstimulation eine gesteigerte Zytotoxizität und IFN γ -Sekretion auf und sind *in vitro* resistenter gegenüber der Hemmung durch T_{Reg}-Zellen (Koneru et al., 2015; Pegram et al., 2012). In verschiedenen präklinischen *in vivo* Modellen induzierten IL-12-sekretierende T- und CAR T-Zellen, selbst bei etablierten, fortgeschrittenen Tumoren, komplette Remissionen und verlängerten das Überleben signifikant. In Studien von Chmielewski et al. konnte die gesteigerte Antitumorwirkung IL-12-sekretierender, CEA (engl. *carcinoembryonic antigen*)-spezifischer CAR T-Zellen zum Teil auf die IL-12-abhängige Aktivierung endogener Makrophagen zurückgeführt werden. Durch die IL-12-vermittelte Aktivierung des endogenen Immunsystems wurden auch Mischtumoren, bestehend aus CEA⁻ und CEA⁺ kolorektalen Adenokarzinomzellen, vollständig abgestoßen (Chmielewski et al., 2011). Konstitutiv IL-12 exprimierende T-Zellen zeigen allerdings eine Reduktion in ihrer Lebensfähigkeit und rufen in *in vivo* Modellen zum Teil schon bei relativ geringen Dosen systemische Toxizitäten hervor (Kerkar et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Um die systemische Toxizität des von genmodifizierten T-Zellen produzierten IL-12 zu reduzieren, wurden auch T-Zelltherapeutika entwickelt, die erst am Tumor, induziert durch Antigenbindung, beginnen IL-12 zu sekretieren (Chmielewski et al., 2011; Zhang et al., 2011). Chmielewski et al. und Zhang et al. verwendeten hierfür jeweils retrovirale Vektoren mit einem von dem Transkriptionsfaktor NFAT (engl. *nuclear factor of activated T-cells*) kontrollierten minimalen IL-2 Promotor. Wird durch die Aktivierung des TCRs oder des CARs die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ausgelöst, führt dies zu einer Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung und Aktivierung von endogenen NFAT (Macian, 2005). Der aktivierte Transkriptionsfaktor wandert anschließend in den Zellkern ein und bindet unter anderem auch die NFAT-Erkennungssequenzen des minimalen IL-2 Promotors, wodurch die Transkription von IL-12 induziert wird. Im Gegensatz zu konstitutiv IL-12 exprimierenden T-Zellen zeigten T-Zellen mit induzierbarer IL-12 Sekretion keine Reduktion der Lebensfähigkeit und auch nach Antigenstimulation eine vergleichbare Expansionsrate wie GFP-

exprimierende Kontroll-T-Zellen. In präklinischen *in vivo* Versuchen verursachten T-Zellen mit induzierbarer IL-12 Sekretion zudem keine systemische Toxizität, wodurch auch höhere, klinisch wirksame Dosen verabreicht werden konnten (Zhang et al., 2011).

Solche CAR-Effektorzellen der 4. Generation stellen gegenwärtig einen sehr vielversprechenden Therapieansatz für solide Tumoren dar. Aktuell werden IL-15- und IL-12-sekretierende CAR-Effektorzellen in klinischen Phase-I Studien beim Neuroblastom und Ovarialkarzinom untersucht (DeRenzo und Gottschalk, 2019).

Immuntherapien mit allogenen Immunzellen

Die meisten zellulären Immuntherapien basieren auf genetisch modifizierten T-Zellen. T-Zellen besitzen viele vorteilhafte Eigenschaften für die Generierung von Zelltherapeutika, sie können technisch einfach isoliert und genetisch modifiziert werden, weisen hohe Expansionsraten auf und persistieren über lange Zeiträume in Patienten (June et al., 2018). Allerdings können aufgrund der Gefahr einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. *graft-versus-host disease*, GvHD) zumeist nur autologe T-Zellen für die Generierung von Zelltherapeutika verwendet werden. Selbst bei MHC-abgestimmten Donoren besteht, aufgrund von nicht-MHC-abhängigen sogenannten *minor histocompatibility*-Antigenen, die Gefahr einer GvH-Reaktion (Goulmy, 1997). Diese Einschränkung auf autologe T-Zellen bringt verschiedene Nachteile mit sich. Zum einen ist die Herstellung von individuellen T-Zellprodukten zeitaufwendig und kostspielig, andererseits kann sich die Isolation von autologen, funktionalen Immunzellen bei älteren und immunkompromittierten Patienten als problematisch erweisen (Graham et al., 2018; Mehta und Rezvani, 2018).

NK-Zellen induzieren im Gegensatz zu T-Zellen keine GvH-Reaktion. Dadurch können sie als allogenes Zellprodukt eingesetzt werden (Saudemont et al., 2018). Die Sicherheit und antitumorale Wirkung von adoptiv transferierten allogenen NK-Zellen, als Monotherapie oder in Kombination mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), wurde in den letzten Jahren in mehreren klinischen Studien bestätigt (Veluchamy et al., 2017). Die Alloreaktivität der transferierten NK-Zellen basiert hierbei auf dem Mechanismus der *missing-self* Detektion. Allogene, von gesunden Spendern isolierte NK-Zellen exprimieren zum Teil von den Patienten unterschiedliche KIRs (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*, KIR), wodurch sie im Gegensatz zu autologen NK-Zellen nicht durch die Expression von Selbst-MHC Molekülen auf den Tumorzellen gehemmt werden. Durch die gezielte Auswahl von KIR- und HLA-fehlgepaarten Spendern ist es somit möglich, die Tumorlyse mittels der Detektion von *missing-self* zu begünstigen und die

Antitumoraktivität von allogenen NK-Zellprodukten zusätzlich zu steigern (Cooley et al., 2010; Sekine et al., 2016). NK-Zellen können ähnlich wie T-Zellen auch mit CARs genetisch modifiziert werden (Uherek et al., 2002). In klinischen Studien werden zurzeit aus dem Nabelschnurblut gewonnene, primäre NK-Zellen mit CARs spezifisch gegen CD19 für die Verwendung bei rezidierten/refraktären Leukämien und Lymphomen untersucht (Kloess et al., 2019; Mehta und Rezvani, 2018). Da CAR NK-Zellen Tumorzellen neben der CAR-vermittelten Lyse weiterhin auch mittels ihrer natürlichen Zytotoxizität erkennen und abtöten können, ist im Vergleich zu CAR T-Zellen das Risiko eines *tumor immune escape* möglicherweise reduziert. Die Herstellung NK-Zell-basierter Immuntherapeutika wird allerdings durch die niedrige Transduktionseffizienz viraler Vektoren und die begrenzte Expansionsrate primärer NK-Zellen erschwert (Boissel et al., 2012; Shimasaki et al., 2016; Sutlu et al., 2012). Fujisaki und Kollegen zeigten, dass ausgereifte primäre NK-Zellen bei *ex vivo*-Kultivierung bereits nach 10 bis 15 Zellteilungen ihre Proliferationsrate reduzierten oder die Proliferation sogar komplett einstellten (Fujisaki et al., 2009). Alternativ zu primären NK-Zellen können auch etablierte NK-Zelllinien als Quelle für NK-Zelltherapeutika verwendet werden. Die zytotoxische, aus einem Non-Hodgkin-Lymphom Patienten isolierte NK-Zelllinie NK-92 kann *in vitro* zu hohen Zellzahlen expandiert werden und weist mit viralen Vektoren eine vergleichsweise hohe Transduktionseffizienz auf (Boissel et al., 2012; Boissel et al., 2009; Klingemann et al., 1996; Zhang et al., 2017). Außerdem besteht bei der Transfusion von reinen, aus Zelllinien generierten NK-Zellpopulationen nicht die Gefahr einer durch eine T-Zell-Kontamination ausgelösten GvH-Reaktion (Shah et al., 2015). Durch Bestrahlung der Zellen wird zudem das mögliche Risiko des dauerhaften Anwachsens der NK-92 Zellen und der Ausbildung eines sekundären Lymphoms stark verringert. Die Sicherheit und klinische Wirksamkeit von NK-92 Zellen wurde in klinischen Phase-I Studien in Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen gezeigt (Arai et al., 2008; Boyiadzis et al., 2017; Tonn et al., 2013; Williams et al., 2017). Inzwischen sind NK-92 Zellen für die Verwendung in zellulären Immuntherapien so gut etabliert, dass diese Zelllinie die am häufigsten verwendete NK-Zellquelle für klinische Studien mit CAR NK-Zellen darstellt (Kloess et al., 2019; Zhang et al., 2017). So wird die in dieser Arbeitsgruppe unter GMP-Bedingungen generierte ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z momentan in einer klinischen Phase-I Studie mit Glioblastom-Patienten (CAR2BRAIN) untersucht und stellt für diese Arbeit ein klinisch relevantes Modell für NK-Zelltherapien dar (Schonfeld et al., 2015; Zhang et al., 2016).

1.3. Ziel dieser Arbeit

Für die Behandlung von B-Zell-basierten Malignitäten wurden bereits zwei CD19-spezifische CAR T-Zellprodukte von der FDA und EMA zugelassen (Kymriah von Novartis und Yescarta von Gilead). CAR-Therapien für solide Tumoren zeigten dagegen bisher trotz vielversprechender präklinischer Daten nur eine geringe therapeutische Wirksamkeit in Patienten. Faktoren, welche die erfolgreiche Behandlung von soliden Tumoren mit CAR-Effektorzellen erschweren, umfassen unter anderem die heterogene Antigenexpression auf den Tumorzellen, wie auch von der Tumormikroumgebung vermittelte immunsuppressive Effekte (Martinez und Moon, 2019). CAR-Zellen der 4. Generation werden neben dem CAR noch mit weiteren Transgenen wie zum Beispiel proinflammatorischen Zytokinen, Antikörpern oder anderen immunstimulatorischen Proteinen ausgestattet, um das Tumormikromilieu zu beeinflussen und endogene Immunzellen zu einer Antitumorreaktion zu stimulieren (Yeku und Brentjens, 2016).

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines solchen neuen CAR-Ansatzes basierend auf ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen (NK-92/5.28.z) und PD-L1-spezifischen, als *Immune Checkpoint*-Inhibitoren wirkenden Immunzytokinen. Die zusätzliche Expression dieser PD-L1-spezifischen Immunzytokine sollte die CAR NK-92 Zellen dazu befähigen, in der Tumorumgebung vorliegende Immunzellen zu stimulieren und bereits initiierte Antitumorreaktionen der endogenen Immunzellen durch die Blockade von PD-L1 aufrechtzuerhalten (Abbildung 1.5). Die mögliche autokrine Stimulation der CAR-Effektorzellen selbst durch die von ihnen exprimierten Immunzytokine stellt einen weiteren Aspekt dieses Ansatzes dar, welcher in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten zunächst vier verschiedene PD-L1-spezifische Antikörperfusionsproteine mit proinflammatorischer Zytokindomäne produziert und anschließend in verschiedenen Assays biochemisch charakterisiert werden. In den anschließend durchgeführten funktionellen Analysen sollte insbesondere die Antikörper-Bindung an PD-L1, die Aktivität der Zytokindomänen und die Wirkung als *Immune Checkpoint*-Inhibitoren analysiert werden, um die Eignung der Immunzytokine für die Kombinationstherapie mit ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen zu beurteilen. Der zweite Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Generierung der unterschiedlichen Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen und ihre vergleichende Analyse *in vitro*. Abschließend sollte beispielhaft die antitumorale Aktivität einer ausgewählten, Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z Variante in einem syngenem Glioblastom-Modell untersucht werden.

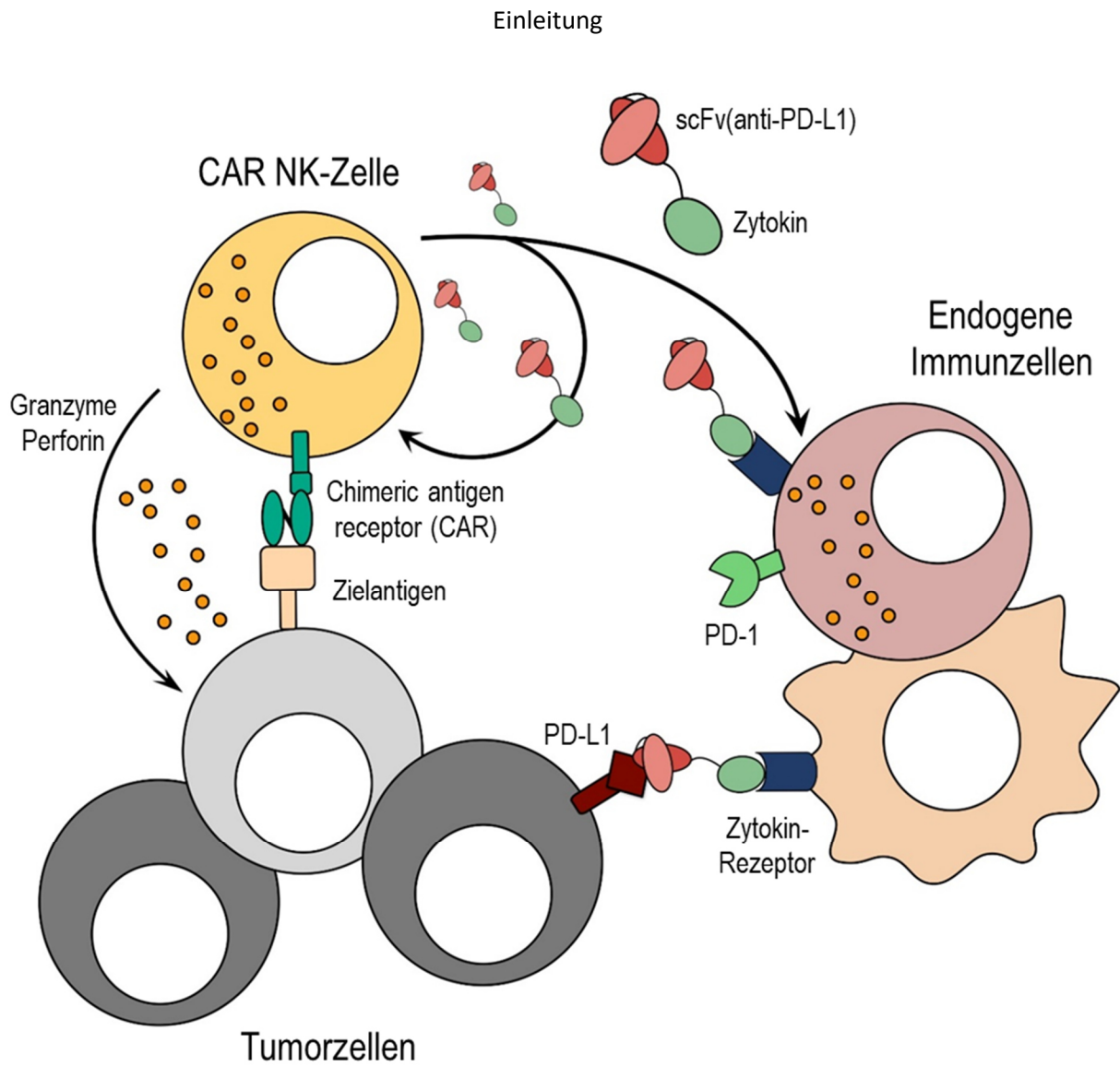


Abbildung 1.5: **Konzept der Sekretion von Antikörperperfusionsproteinen durch ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen.** Die genetisch modifizierten NK-92 Zellen exprimieren einen ErbB2-spezifischen CAR und sekretieren konstitutiv PD-L1-spezifische Antikörperperfusionsproteine mit proinflammatorischer Zytokindomäne. Mithilfe des CARs erkennen die NK-92 Zellen ErbB2-exprimierende Tumorzellen und lysieren diese durch die Freisetzung von Granzymen und Perforin. Die sekretierten Immunzytokine blockieren zudem durch Bindung an PD-L1 auf Tumorzellen die Aktivierung des immunregulatorischen Rezeptors PD-1 und stimulieren mithilfe der enthaltenen Zytokindomänen umgebende, endogene Immunzellen.

2. Material

2.1. Laborgeräte und Apparaturen

Tabelle 2.1.1: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Apparaturen.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Autoklav | FVS2 + UWK 20.0 Fedegari |
| Bestrahlungseinheit | Biobeam GM 2000 (Gamma Service Medical, Leipzig) |
| Blottingapparatur | Fröbel Labortechnik (Wasserburg) |
| Brutschränke | Zellkultur-Inkubator: Integra Biosciences (Fernwald) Bakterien-Inkubator: Heraeus |
| Durchflusszytometer: FACSAria FACSAria Fusion FACSCanto II LSRFortessa | Alle BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Elektrophoresekammern | Agarosegele: BioRad (München) SDS-Page: BioRad (München) |
| Gefrierschränke | -20 °C: Liebherr (Biberach) -80 °C: New Brunswick/Eppendorf (Hamburg) |
| Geldokumentationssystem | Fusion Fx7: Peqlab (Erlangen) |
| Heizblock | Techne (Dexford-Cambridge, United Kingdom) |
| Infrared imaging system Li-COR Odyssey | Li-COR Biosciences (Lincoln Nebraska, USA) |
| Inkubationsschüttler | Multitron: Infors (Bottmingen, Schweiz) |
| Kühlschränke | Liebherr (Biberach) |
| Magnetrührer | IKA Mag RCT (Staufen) |
| Mikroskope | Nikon TMS: Nikon (Düsseldorf) Axiovert 25: Zeiss (Oberkochen) |
| Mikrowelle | Mikromat: AEG (Nürnberg) |
| Netzgeräte | Power Pac 300: BioRad (München) ECPS 3000/150: Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| PCR-Maschine | Biometra® T3000 Thermocycler RT-PCR: Biometra GmbH (Göttingen) LightCycler® 480: Roche (Basel, Schweiz) |
| pH-Meter | MP 220: Mettler Toledo (Gießen) |
| Pipetten und Pipettierhilfe | P2, P20, P200, P1000 Pipetten: Gilson (Middleton, USA) Pipetboy acu: Integra Biosciences (Fernwald) |
| Rollenmischer | RM5-30V: CAT/M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen) |
| Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine | XR 24 Pro: Dürr Dental (Bietigheim-Bissingen) |
| Sonifikator | Bioruptor: Diagenode (Seraing, Belgien) |

Material

| | |
|---------------------------|---|
| Spektrophotometer | Anthos Reader 2001: Anthos Labtec Instruments GmbH (Salzburg, Österreich) Evolution 60: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Nanodrop 1000: Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Sterilbank | Zellkultursterilbank: CleanAir by Baker (Utrecht, Niederlande) Bakterien-Sterilbank: Ceag Schirp (Bork) |
| Vortex-Gerät | Vortex-Genie 2: Scientific Industries (Bohemia, USA) |
| Waage | Explorer: Ohaus (Greifensee, Schweiz) |
| Wasseraufbereitungsanlage | Elix: Millipore (Schwalbach) |
| Wasserbad | GFL (Burgwedel) |
| Zentrifugen | Avanti™ J-25: Beckmann Coulter (Krefeld) Biofuge pico: Heraeus (Hanau) Megafuge 1.0R: Heraeus (Hanau) Mikro 22R: Hettich (Tuttlingen) Rotina 46 R: Hettich (Tuttlingen) Z 160M: Hermle Labortechnik (Wehingen) |

2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2.1: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Autoradiographie-Film | Super RX; Fujifilm Europe (Düsseldorf) |
| Einmal-Küvetten | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Filterspitzen | Fisher Scientific (Hampton, USA) |
| Plastikwaren | Corning (New York, USA), Greiner Bio-One (Frickenhausen), BD Biosciences (Franklin Lakes, USA), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm) | Merck Millipore (Darmstadt) |
| Whatman Filterpapier | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Zählkammer | KOVA® GLASSTIC® Slide 10: Kova International (Garden Grove, USA) |
| Zellkultureinsätze (ThinCERT™ Cell Culture Inserts) | Greiner Bio-One (Österreich) |

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3.1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Calcein Violet AM | Invitrogen/ Life Technologies (Carlsbad, USA) |
| CellTrace™ CFSE | Invitrogen/ Life Technologies (Carlsbad, USA) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Magermilchpulver | Fluka® Analytica (München) |
| Natriumdodecylsulfat (<i>sodium lauryl sulfate</i> , SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Polybren | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Polyethylenimin, 25 kDa linear (PEI) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Restriktionsenzyme | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| TWEEN® 20 | Carl Roth (Karlsruhe) |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |

2.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 2.4.1: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

| Puffer und Lösungen | Zusammensetzung/Hersteller |
|---|--|
| CutSmart® Puffer | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| DNA-Ladepuffer | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| DPBS (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>) 1x | Gibco (Waltham, USA) |
| PBST (<i>phosphate buffered saline-Tween 20</i>) | 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl 2,67 mM KCl, 0,05 % [v/v] TWEEN 20, pH 7,5 |
| TBST (<i>tris-buffered saline-Tween 20</i>) | 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1 % [v/v] TWEEN 20, pH 7,5 |
| Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) | 1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH 8,0 eingestellt mit Eisessig |
| 0,4 % Trypanblau-Lösung | Gibco (Waltham, USA) |
| 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung | Gibco (Waltham, USA) |

2.5. Rekombinante Proteine

Tabelle 2.5.1: In dieser Arbeit generierte und verwendete rekombinante Proteine.

| Rekombinantes Protein | Hersteller |
|--|--|
| IgG4-Fc | Sino Biological Inc. (Peking, China) |
| IL-2 (Proleukin® S) | Novartis AG (Basel, Schweiz) |
| IL-12 (p70, murin) | PeproTech GmbH (Hamburg) |
| IL-15 | PeproTech GmbH (Hamburg) |
| PD-L1-Fc | R&D Systems (Minneapolis, USA) |
| Streptavidin-HRP | GenScript (Piscataway, USA) |
| scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc (anti-PDL1-Fc) | In dieser Arbeit generiert. Der rekombinante Antikörper scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc besteht aus einem PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von Atezolizumab, und einem IgG4-Fc Teil. Die Fc-Domäne wurde über eine von IgG1 abgeleitete <i>hinge</i> -Region an den C-Terminus des scFv-Antikörperfragments gekoppelt. |
| scFv(anti-PD-L1)-scIL-12 (anti-PDL1-scIL12) | In dieser Arbeit generiert. Das rekombinante Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-scIL-12 besteht aus einem PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von Atezolizumab, und dem murinen Zytokin IL-12. Die Zytokindomäne ist über eine modifizierte von IgG1 abgeleitete <i>hinge</i> -Region mit dem C-Terminus des scFv-Antikörperfragments verbunden. Die zwei Untereinheiten von IL-12, p40 und p35, sind über einen GS-Linker verbunden. |
| scFv(anti-PD-L1)-IL-15 (anti-PDL1-IL15) | In dieser Arbeit generiert. Das rekombinante Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-IL-15 besteht aus einem PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von Atezolizumab, und dem humanen Zytokin IL-15. Die Zytokindomäne befindet ist über eine modifizierte von IgG1 abgeleitete <i>hinge</i> -Region mit dem C-Terminus des scFv-Antikörperfragments verbunden. |
| scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15 (anti-PDL1-RD-IL15) | In dieser Arbeit generiert. Das rekombinante Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15 besteht aus einem PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von Atezolizumab, und einem humanen IL-15-Superagonist. Der IL-15-Superagonist besteht aus einer humanen IL-15-Mutante (N72D), und der Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptor α (Aminosäuren 31-107). Die Sushi-Domäne ist, jeweils über einen GS-Linker, mit dem C-Terminus des scFv-Antikörperfragments und dem N-Terminus der IL-15-Mutante verbunden. |
| RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1) (RD-IL15-anti-PDL1) | In dieser Arbeit generiert. Das rekombinante Antikörperfusionsprotein RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1) besteht aus einem PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von Atezolizumab, und einem humanen IL-15-Superagonist. Der IL-15-Superagonist besteht aus einer humanen IL-15 Mutante (N72D), und der Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptor α (Aminosäuren 31-107). Die IL-15-Mutante ist, jeweils über einen GS-Linker, mit dem N-Terminus des scFv-Antikörperfragments und dem C-Terminus der Sushi-Domäne verbunden. |

2.6. Antikörper

Tabelle 2.6.1: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

| Zielantigen | Klon/Spezies | Markierung | Hersteller | Eingesetzte Verdünnung |
|--|-----------------------|------------|-------------------------|------------------------|
| <u>Antikörper verwendet in ELISAs:</u> | | | | |
| Atezolizumab | 6B12 Maus | Biotin | GenScript | 1:250 |
| Atezolizumab | 10G9 Maus | - | GenScript | 1:250 |
| PD-L1 | Atezolizumab Human | - | InvivoGen | |
| <u>Primärantikörper für durchflusszytometrische Analysen:</u> | | | | |
| CD3 (human) | UCHT-1 Maus | V500 | BD | 1:50 |
| CD8 (human) | BW135/80 Maus | APC | Miltenyi | 1:40 |
| CD56 (human) | B159 Maus | BV421 | BD | 1:50 |
| His ₆ -Tag | 362605 Maus | APC | Biolegend | 1:50 |
| PD-1 (human) | EH12.2H7 Maus | PE | Biolegend | 1:40 |
| PD-L1 (human) | MIH1 Maus | PE | BD | 1:200 |
| PD-L1 (murin) | MIH5 Ratte | APC | BD | 1:333 |
| <u>Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Analysen:</u> | | | | |
| IgG-Fc (human) | Ziege | APC | Jackson Immuno Research | 1:200 |
| IgG-Fc (human) | Ziege | FITC | Jackson Immuno Research | 1:200 |
| <u>Primärantikörper für Immunoblot-Analysen:</u> | | | | |
| Atezolizumab | 10G9 Maus | - | GenScript | 1:250 |
| HA-Tag | 6E2 Maus | - | CellSignaling | 1:1000 |
| His-Tag | 13/45/31-2 Maus | - | Dianova | 1:1000 |

Material

| | | | | |
|---|--------------------------------|------------|---------------|---------|
| IL-12 (p40/p70) (murin) | C17.8 Ratte | - | BD | 1:1000 |
| IL-15 (human) | MAB2471 | - | R&D Systems | 1:250 |
| IL-15R α (human) | Polyklonal (AF247) Ziege | - | R&D Systems | 1:1000 |
| PD-L1 (human) | 405.9A11 Maus | - | CellSignaling | 1:1000 |
| pSTAT4 (human) | 38/p-Sat4 Maus | - | BD | 1:1000 |
| pSTAT5 (human) | C11C5 | - | CellSignaling | 1:1000 |
| STAT4 (human) | C46B10 Hase | - | CellSignaling | 1:1000 |
| STAT5 (human) | 89/Stat5 Maus | - | BD | 1:1000 |
| γ -Tubulin (human) | Hase | - | Sigma | 1:2000 |
| <u>Sekundärantikörper für Immunoblot-Analysen:</u> | | | | |
| Hase IgG | Ziege | HRP | Sigma-Aldrich | 1:16000 |
| Maus IgG | Ziege | HRP | Sigma-Aldrich | 1:16000 |
| Ziege IgG | Hase | HRP | Sigma-Aldrich | 1:16000 |
| Ratte IgG | Ziege | HRP | Invitrogen | 1:16000 |
| Human IgG | Ziege | HRP | Sigma-Aldrich | 1:16000 |
| Hase IgG | Ziege | IRDye800CW | Li-COR | 1:16000 |
| Maus IgG | Ziege | IRDye680RD | Li-COR | 1:16000 |
| Ziege IgG | Esel | IRDye800CW | Li-COR | 1:16000 |
| Ratte IgG | Ziege | IRDye680LT | Li-COR | 1:16000 |

2.7. Plasmide

Tabelle 2.7.1: In dieser Arbeit generierte und verwendete Plasmide. CMV: Cytomegalievirus, IRES: internal ribosome entry site, SFFV: Spleen Focus Forming Virus, iRFP: near-infrared fluorescent protein, HIV-1: human immunodeficiency virus type 1.

| Bezeichnung | Eigenschaft | Referenz |
|--------------------------------|---|---------------------------------|
| pCMV_ Δ R8.91 | Lentivirales Verpackungsplasmid; abgeleitet von HIV-1, welches für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, wie auch für die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (pol) kodiert. | (Zufferey et al., 1997) |
| pMD2.G | Lentivirales Verpackungsplasmid, welches das <i>Vesicular Stomatitis Virus Protein-G</i> (VSV-G) kodiert. | (Zufferey et al., 1997) |
| pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc | Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für den PD-L1-spezifischen Miniantikörper anti-PDL1-Fc. Der Miniantikörper wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. | Anja Waldmann, unveröffentlicht |

Material

| | | |
|----------------------------------|--|-----------------------------|
| pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12 | Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-scIL-12, mit muriner scIL-12-Domäne. Das Antikörperfusionsprotein wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. | In dieser Arbeit generiert. |
| pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-IL-15 | Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-IL-15, mit humaner IL-15-Domäne. Das Antikörperfusionsprotein wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. | In dieser Arbeit generiert. |
| pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15 | Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15, mit humanem IL-15-Superagonist. Das Antikörperfusionsprotein wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. | In dieser Arbeit generiert. |
| pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1) | Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1), mit humanem IL-15-Superagonist. Das Antikörperfusionsprotein wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. | In dieser Arbeit generiert. |
| pS-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-IRW | Lentivirales Transferplasmid kodierend für den PD-L1-spezifischen Miniantikörper scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc. Die Expression des Miniantikörpers steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und iRFP als Markergen. | In dieser Arbeit generiert. |
| pS-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12-IRW | Lentivirales Transferplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-scIL-12, mit murinem IL-12. Die Expression des Antikörperfusionsproteins steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und iRFP als Markergen. | In dieser Arbeit generiert. |
| pS-scFv(anti-PD-L1)-IL-15-IRW | Lentivirales Transferplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-IL-15, mit humaner IL-15-Domäne. Die Expression des Antikörperfusionsproteins steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und iRFP als Markergen. | In dieser Arbeit generiert. |
| pS-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15-IRW | Lentivirales Transferplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15, mit humanem IL-15-Superagonist. Die Expression des Antikörperfusionsproteins steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und iRFP als Markergen. | In dieser Arbeit generiert. |
| pS-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1)-IRW | Lentivirales Transferplasmid kodierend für das PD-L1-spezifische Antikörperfusionsprotein RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1), mit humanem IL-15-Superagonist. Die Expression des Antikörperfusionsproteins steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und iRFP als Markergen. | In dieser Arbeit generiert. |

2.8. Oligonukleotide

Tabelle 2.8.1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

| Bezeichnung | Sequenz [5'-3'] | Orientierung | Verwendung |
|-------------|---|--------------|--|
| pcDNA3 FP | CTCTGGCTAACTAGA GAAC | vorwärts | Sequenzierung von Transgenen enthalten in pcDNA3-Expressionsplasmiden; bindet im CMV Promotor |
| pcDNA3 RP | CAAACAACAGATGGC TGGC | rückwärts | Sequenzierung von Transgenen enthalten in pcDNA3-Expressionsplasmiden; bindet im BGH Polyadenylierungssignal |
| AL 2 | GAGGACTTCGCCACCTA | vorwärts | Sequenzierung der Zytokindomäne / des Fc-Teils; bindet an V _L von scFv(anti-PD-L1) |
| AL 3 | GTTTCCGCCCTTGCACT | rückwärts | Sequenzierung des murinen sclL-12; bindet an p40 |
| AL 4 | TGGAAGTGTCTGGGA GT | vorwärts | Sequenzierung des murinen sclL-12; bindet an p40 |
| AL 5 | TCGGGCACGTCGTAGG GGTAGCTGGTGTGAT GAACATCTGCACG | rückwärts | Klonierung von pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15; bindet an die IL-15-Mutante und an den HA-Tag |
| AL 6 | CCGCCACCGGTGCCCAT TCTATCACCTGCTCTCC ACCTATGAG | vorwärts | Klonierung von pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1); bindet an das Signalpeptid und die Sushi-Domäne |
| AL 10 | CCGCCACCGGTGCCCAT TCTGAAGTGCAGCTGG TGGAATC | vorwärts | Klonierung von pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15; bindet an das Signalpeptid und an V _H von scFv(anti-PD-L1) |
| AL12 | TCGGGCACGTCGTAGG GGTACTTGATTCCACC TTGGTGTC | rückwärts | Klonierung von pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1); bindet an V _L von scFv(anti-PD-L1) und den HA-Tag |
| AL 13 | GCTGCACTTCAGATCCC CCTCCCCCTGATC | rückwärts | Klonierung von pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1); bindet an V _H von scFv(anti-PD-L1) und den GS-Linker |
| AL 14 | AGGGGGATCTGAAGTG CAGCTGGTGGAATC | vorwärts | Klonierung von pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1); bindet an V _H von scFv(anti-PD-L1) und den GS-Linker |
| AL 33 | AGGTGGAGGACAGGTG ATAGATCCCCCTCCCC TGATCCTCCGCCGCTG ATCCGCCTCCCTTGATT TCCACCTTGGTGTC | rückwärts | Klonierung von pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15; bindet an V _L von scFv(anti-PD-L1) |
| AL 34 | ATCACCTGCTCCACC TATGAG | vorwärts | Klonierung von pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15; bindet an die IL-15-Mutante |
| AL 45 | TAGGCGGTGTTCTTG CTG | rückwärts | Sequenzierung von RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1); bindet an V _H von scFv(anti-PD-L1) |

Material

| | | | |
|---------|---|-----------|---|
| AL38 | CTAAGCTTGGATCCCCG CGGGCCACCATGGACT GGATTG | vorwärts | Klonierung von pS-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-IL-15-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15-IRW, pS-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1)-IRW, bindet an das Signalpeptid |
| AL 39 | ACTCGTCAGTTCTCCG CGGTCATTACCCAGAG ACAGGG | rückwärts | Klonierung von pS-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-IRW, bindet an IgG4-Fc |
| AL 41 | ACAGCGCCGCGGGCTC AGTGATGGTGGTGGTG ATGGG | rückwärts | Klonierung von pS-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-IL-15-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15-IRW, pS-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1)-IRW, bindet an HA- und His-Tag |
| BPK 6 | GCTTCTGCTTCCCGA GCTC | vorwärts | Sequenzierung von pSIRW-Konstrukten; bindet im SFFV-Promotor |
| BPK 7rc | CACACCGGCCTTATTC CAAG | rückwärts | Sequenzierung von pSIRW-Konstrukten; bindet an IRES |

2.9. Bakterienstämme

Für Klonierungen mit eukaryotischen Expressionsplasmiden wurde der chemokompetente Bakterienstamm *E. coli* TOP10 verwendet. Für Klonierungen mit lentiviralen Transferplasmiden wurde der chemokompetente, rekombinationsdefiziente Bakterienstamm *E. coli* Stbl3 verwendet.

Tabelle 2.9.1: In dieser Arbeit verwendete chemokompetente Bakterienstämme.

| Bakterienstamm | Genotyp | Referenz |
|----------------------|---|----------------------------------|
| <i>E. coli</i> TOP10 | F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG | (Hanahan, 1983) |
| <i>E. coli</i> Stbl3 | F ⁻ mcrB mrrhsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ ⁻ leumtl-1 | Invitrogen/ Life Technologies |

2.10. Bakterienmedien und Antibiotika

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedien und LB-Agar wurden zunächst bei 121 °C und einem Dampfdruck von 180 - 200 kPa für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C wurde das gewünschte Antibiotikum zugesetzt.

Tabelle 2.10.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienmedien und Antibiotika.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---------------------------|--|
| Ampicillin | InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich) 100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert |
| Luria Bertani (LB)-Medium | 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton gelöst in 1 l ddH ₂ O |
| LB-Selektions-Medium | LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin oder LB-Medium 50 µg/ml Kanamycin |
| LB-Ampicillin-Agar | LB-Medium 1,5 % [w/v] Agar-Agar 100 µg/ml Ampicillin |
| LB-Kanamycin-Agar | LB-Medium 1,5 % [w/v] Agar-Agar 50 µg/ml Kanamycin |
| Kanamycin | InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich) 50 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert |

2.11. Zellkulturmedien und Zusätze

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die nachfolgend aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen angesetzt und verwendet. Das als Zellkulturzusatz verwendete fötale Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) und das humane Plasma wurden für 30 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Tabelle 2.11.1: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.

| Bezeichnung | Zusammensetzung/Hersteller |
|---------------------------------------|---|
| DMEM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen) | DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco) 10 % [v/v] FCS (Hitze-inaktiviert) 2 mM L-Glutamin 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x) |
| Einfriermedium NK-92 | 10 % [v/v] DMSO in humanem Plasma |
| Einfriermedium Tumorzellen | 10 % [v/v] DMSO in FCS |
| FCS (<i>fetal calf serum</i>) | Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund) |
| Geneticin (G418) | InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich) |
| Humanes Plasma | DRK (Deutsches Rotes Kreuz)-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen |
| IL-2 | Proleukin® S (Novartis Pharma) |
| L-Glutamin | Gibco (Waltham, USA) |
| Opti-MEM | Gibco (Waltham, USA) |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) | Gibco (Waltham, USA) |
| RPMI ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen) | RPMI 1640 (Gibco) 10 % [v/v] FCS (Hitze-inaktiviert) 2 mM [v/v] L-Glutamin 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x) |
| X-VIVO ⁺⁺ (mit Zusätzen) | X-VIVO 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5 % [v/v] humanes Plasma (Hitze-inaktiviert) 100 IU/ml IL-2 |

2.12. Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden etablierte humane und murine Zelllinien verwendet (Tabelle 2.12.1). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden in verschiedenen Experimenten für kürzere Zeitperioden kultiviert, die dabei verwendeten Kulturbedingungen und Medien sind in den dazugehörigen Methodenteilen (3.3) beschrieben.

Material

Tabelle 2.12.1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und dazugehörige Zellkulturmedien.

| Zelllinie | Beschreibung | Kultur- medium | Referenz/ ATCC-Nr. |
|--------------------------|---|--|-------------------------------|
| A431 | Humanes epidermoides Karzinom | DMEM ⁺⁺⁺ | CEL-1555 |
| GL261 | Murines (C57BL/6) Glioblastom | DMEM ⁺⁺⁺ | ACC-802 |
| GL261/ErbB2 | Murine (C57BL/6) Glioblastomzellen transfiziert mit humanen ErbB2. | DMEM ⁺⁺⁺ 0,4 mg/ml G418 | (Zhang et al., 2016) |
| HEK293 | Humane embryonale Nierenzellen | DMEM ⁺⁺⁺ | CRL-1573 |
| HEK293/anti-PDL1-Fc | Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc, zur Produktion des scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc Miniantikörpers. | DMEM ⁺⁺⁺ / Opti-MEM 1 mg/ml G418 | In dieser Arbeit generiert. |
| HEK293/anti-PDL1-IL12 | Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12, zur Produktion des Immunzytokins scFv(anti-PD-L1)-scIL-12. | DMEM ⁺⁺⁺ / Opti-MEM 1 mg/ml G418 | In dieser Arbeit generiert. |
| HEK293/anti-PDL1-IL15 | Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-IL-15, zur Produktion des Immunzytokins scFv(anti-PD-L1)-IL-15. | DMEM ⁺⁺⁺ / Opti-MEM 1 mg/ml G418 | In dieser Arbeit generiert. |
| HEK293/anti-PDL1-RD-IL15 | Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15, zur Produktion des Immunzytokins scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15. | DMEM ⁺⁺⁺ / Opti-MEM 1 mg/ml G418 | In dieser Arbeit generiert. |
| HEK293/RD-IL15-anti-PDL1 | Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDNA3-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1), zur Produktion des Immunzytokins RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1). | DMEM ⁺⁺⁺ / Opti-MEM 1 mg/ml G418 | In dieser Arbeit generiert. |
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzellen; exprimieren das große T-Antigen von SV40. | DMEM ⁺⁺⁺ | CRL-11268 |
| K562 | Humane chronische myeloische Leukämie | RPMI ⁺⁺⁺ | CCL-243 |
| MDA-MB453 | Humanes Mammakarzinom | DMEM ⁺⁺⁺ | HTB-131 |
| MDA-MB468 | Humanes Mammakarzinom | DMEM ⁺⁺⁺ | HTB-132 |
| NK-92 | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom | X-VIVO ⁺⁺ | CRL-2407 |
| NK-92/5.28.z | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit dem lentiviralen Vektor pS-5.28.z-W. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z. | X-VIVO ⁺⁺ | (Schonfeld et al., 2015) |

Material

| | | | |
|--------------------------------|--|----------------------|----------------------------|
| NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IgG | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit den lentiviralen Vektoren pS-5.28.z-W und pS-scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-IRW. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z und den PD-L1-spezifischen Miniantikörper scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc. | X-VIVO ⁺⁺ | In dieser Arbeit generiert |
| NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL12 | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit den lentiviralen Vektoren pS-5.28.z-W und pS-scFv(anti-PD-L1)-scIL-12-IRW. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z und das PD-L1-spezifische Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-scIL-12. | X-VIVO ⁺⁺ | In dieser Arbeit generiert |
| NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit den lentiviralen Vektoren pS-5.28.z-W und pS-scFv(anti-PD-L1)-IL-15-IRW. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z und das PD-L1-spezifische Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-IL-15. | X-VIVO ⁺⁺ | In dieser Arbeit generiert |
| NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit den lentiviralen Vektoren pS-5.28.z-W und pS-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15-IRW. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z und das PD-L1-spezifische Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15. | X-VIVO ⁺⁺ | In dieser Arbeit generiert |
| NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 | Humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit den lentiviralen Vektoren pS-5.28.z-W und pS-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1)-IRW. Exprimiert den ErbB2-spezifischen CAR 5.28.z und das PD-L1-spezifische Immunzytokin RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1). | X-VIVO ⁺⁺ | In dieser Arbeit generiert |

2.13. Mäusstämme

Die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Studien wurden mit C57BL/6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Techniken

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Polymerase-Kettenreaktionen (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurden durchgeführt, um gewünschte DNA-Bereiche zu amplifizieren oder um Restriktionsschnittstellen für weitere Klonierungsschritte einzufügen. Die PCR wurde wie in Tabelle 3.1.1 erläutert angesetzt und mit der in Tabelle 3.1.2 genannten Programmroutine in einer Biometra® TGradient PCR-Maschine oder in einem Biometra® T3000 Thermocycler von Whatman durchgeführt.

Tabelle 3.1.1: Reagenzien und Reaktionsansatz für eine PCR.

| Reagenzien | Reaktionsansatz |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>template</i> -DNA | 50 – 100 ng |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl |
| Q5-Polymerasepuffer | 10 µl |
| GC Enhancer | 10 µl |
| <i>forward</i> -Primer (10 µM) | 1 µl |
| <i>reverse</i> -Primer (10 µM) | 1 µl |
| Q5-Polymerase | 1 µl |
| ddH ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle 3.1.2: Programmroutine für eine mit Q5-Polymerase durchgeführte PCR.

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------|------------------------------------|-----------|--------|
| Denaturierung | 98 °C | 30 sek | 1 |
| Denaturierung | 98 °C | 20 sek | 25 |
| Hybridisierung | T _A (Primer-spezifisch) | 30 sek | |
| Elongation | 72 °C | 30 sek/kb | |
| Finale Extension | 72 °C | 10 min | 1 |

Der zu amplifizierende DNA-Bereich wurde für die PCR durch sequenzspezifische Oligonukleotide definiert. Um die Bildung von unspezifischen PCR-Fragmenten zu vermeiden, wurde mit Hilfe des

Online-Dienstes „tmcalculator“ von New England Biolabs (tmcalculator.neb.com) die Primer-spezifische, optimale *annealing*-Temperatur T_A für den Hybridisierungsschritt bestimmt. Nach der erfolgten PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels eines Agarosegels aufgetrennt und mit einem Gel-Extraktionskit isoliert (siehe Abschnitte 3.1.5 und 3.1.6).

3.1.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Mittels Restriktionsendonukleasen können DNA-Fragmente sequenzspezifisch gespalten werden. Hierfür wurden jeweils 2 µg DNA mit 5 U des entsprechenden Restriktionsenzym für 2 h inkubiert. Reaktionspuffer und Temperatur wurden entsprechend der Herstellerangaben des Restriktionsenzym ausgewählt. Bei Verdau mit zwei oder mehr Restriktionsendonukleasen wurden Reaktionsbedingungen gewählt, bei denen alle verwendeten Enzyme aktiv sind, oder die DNA wurde in mehreren Schritten nacheinander verdaut. Um eine Religation von verdauten Plasmid-Vektoren zu verhindern, wurden die Enden der entstandenen DNA-Fragmente zusätzlich mit 1 U *Calf Intestinal Phosphatase* bei 37 °C für 1 h dephosphoryliert. Für nachfolgende Klonierungsschritte wurden die Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert oder die DNA-Fragmente über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Gel-Extraktionskit isoliert.

3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von zwei oder mehr DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase von New England Biolabs verwendet. Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation des Plasmidvektors zu verringern, wurden 50 ng Plasmidvektor in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit DNA-Inserts und 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) angesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Anschließend wurden die Ansätze ohne weitere Aufreinigung für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet.

3.1.4. Isothermaler Zusammenbau nach Gibson

Die Methode des isothermalen Zusammenbaus nach Gibson (engl. *Gibson assembly*) ermöglicht das Verknüpfen von mehreren DNA-Fragmenten ohne den Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Das Funktionsprinzip des *Gibson assembly* basiert auf einem Zwei-Stufen-Prozess. Zuerst werden die für die Klonierung benötigten DNA-Fragmente in einer PCR amplifiziert und homologe DNA-Sequenzen mittels Überhangprimer angehängt. In einem zweiten Schritt werden einzelsträngige 3' DNA-Überhänge durch eine DNA-Exonuklease generiert, welche die Hybridisierung der DNA-Fragmente an den homologen Sequenzen ermöglichen. Gleichzeitig werden die fehlenden Nukleotide durch eine DNA-Polymerase wieder aufgefüllt und die hybridisierten DNA-Stränge ligiert. Für eine Klonierung mittels *Gibson assembly* wurde das NEBuilder® *HiFi DNA Assembly Cloning Kit* (New England Biolabs) verwendet. Die benötigten DNA-Fragmente wurden wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben in einer PCR generiert und nach Herstellerangaben für den *Gibson assembly* angesetzt. Nach abschließender Inkubation bei 50 °C für 20 min wurde der Reaktionsansatz direkt für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet.

3.1.5. DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

| | |
|----------------------------------|--|
| Agarose | 1 % [w/v] in 1x TAE-Puffer |
| 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer | 40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 eingestellt mit Eisessig |
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 10 mg/ml (Roth) 1:10.000 verdünnt im Agarosegel |
| DNA-Ladepuffer | <i>Gel Loading Dye, Purple</i> (6X) (New England Biolabs) |
| DNA-Größenstandards | 1 kb+ DNA-Marker (Thermo Scientific) 100 bp+ DNA-Marker (Thermo Scientific) |

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine größenabhängige Auftrennung von Nukleinsäureketten und wurde angewendet, um durch PCR (3.1.1) oder Restriktionsverdau (3.1.2) generierte DNA-Fragmente zu analysieren und zu isolieren. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid separiert. Während der Gelelektrophorese wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt und 1x TAE Puffer als Laufpuffer verwendet. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektiert und isoliert.

3.1.6. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht detektiert und die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des *GeneJET Gel Extraction Kit* von Thermo Scientific aus dem Agarosegel nach Herstellerangaben isoliert und mit 20 µl ddH₂O eluiert.

3.1.7. Herstellung von chemokompetenten Bakterien

| | |
|-------------------------|--|
| Transformationspuffer 1 | 100 mM RbCl |
| | 50 mM MnCl ₂ |
| | 30 mM KAc |
| | 10 mM CaCl ₂ |
| | 13 % (v/v) Glycerin |
| Transformationspuffer 2 | pH 5.8 eingestellt mit Eisessig, sterilfiltriert |
| | 10 mM MOPS (pH 7,0) |
| | 10 mM RbCl |
| | 75 mM CaCl ₂ |
| | 13 % (v/v) Glycerin |
| | pH 7.0 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert |

Für die Herstellung von chemokompetenten Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* Bakterien (Stamm TOP10 oder Stbl3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 400 ml LB-Medium mit der Vorkultur gemischt und bei 37 °C weiter kultiviert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 15 min auf Eis abgekühlt und danach bei 6000 g, 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 133 ml eiskaltem Transformationspuffer 1 resuspendiert und für weitere 2 h auf Eis gekühlt. Danach wurden die Bakterien erneut bei 6000 g, 4 °C pelletiert und in 10 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 aufgenommen. Die so erzeugten chemokompetenten Bakterien wurden aliquotiert und mittels flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bis zur ihrer Verwendung wurden die chemokompetenten Bakterien bei -80 °C gelagert.

3.1.8. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die zu transformierenden chemokompetenten *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Für die Transformation von eukaryotischen Expressionsplasmiden wurden 50 µl TOP10 Bakteriensuspension mit 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 50 sek bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach für weitere 5 min auf Eis gekühlt. Die transformierten Bakterien wurden für 1 h in 500 µl LB-Medium bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einer LB-Agar-Platte, mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert (2.10). Die Transformation von lentiviralen Vektoren erfolgte auf gleiche Weise unter Verwendung des rekombinationsdefizienten *E. coli* Stamms Stbl3.

3.1.9. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Einzelne *E. coli* Kolonien wurden von der Transformationsplatte gepickt und über Nacht bei 37 °C in LB-Selektionsmedium (2.10) expandiert. Für analytische Zwecke wurden jeweils 5 ml Bakterienkultur pelletiert und die Plasmid-DNA wurde mittels des peqGold® Plasmid Miniprep Kits I (Pepqlab) nach Herstellerangaben isoliert. Größere DNA-Mengen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen mit dem NucleoBond® Xtra Maxi-Kit (Machery-Nagel) isoliert.

3.1.10. Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Sequenzierung

Die Konzentration von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde an einem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Hierfür wurden 2 µl der DNA-Probe auf die Messoberfläche des Geräts pipettiert und bei einer Wellenlänge von 230 nm die Absorption gemessen. Für eine Sequenzanalyse wurden 500 ng DNA mit jeweils 2 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Die Sequenzierung erfolgte durch den externen Sequenzierservice der Firma GATC (Freiburg), später Eurofins Scientific (Luxemburg). Die anschließende Analyse der Daten wurde mit der Software DNASTAR LaserGene SeqMan durchgeführt.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Herstellung von Zelllysaten

| | |
|---|---|
| RIPA (<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>)-Puffer | 50 mM Tris HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1 % [w/v] SDS 0,5 % [w/v] Na-Desoxychelat 1 % [v/v] NP-40 sterilfiltriert |
| 7x Complete Protease-Inhibitor Cocktail | 1 Tablette in 1,5 ml RIPA-Puffer |
| 10x PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail | 1 Tablette in 1 ml RIPA-Puffer |

Die zu lysierenden Zellen wurden geerntet (3.3.1) und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 40 – 100 µl Lyse-Puffer (Complete Protease-Inhibitor 1:7 [v/v] und PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor 1:11 [v/v] angesetzt mit RIPA-Puffer) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Sonifikation, zwei mittlere Impulse für 30 sek, weiter aufgeschlossen. Das Proteinlysate wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C von Zellfragmenten abgetrennt und abgenommen. Die Lysate wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration (3.2.2) direkt für weitere Analysen verwendet oder bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde in einem quantitativen Bradford-Test bestimmt. 2 µl Probe wurde nach Herstellerangaben mit Bradfordlösung versetzt und die Absorption bei 595 nm am Evolution 60 Spektrophotometer gemessen. Die Proteinkonzentration konnte durch Messung einer BSA-Standardkurve und der Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet werden.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Bei gleichbleibender Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (b) und demselben substanzspezifischen, dekadischen Extinktionskoeffizient (ε_{λ}), ist die gemessene Extinktion E_{λ} linear abhängig von der vorhandenen Stoffmengenkonzentration (c).

3.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

| | |
|-------------------------------------|--|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung | 30 % [w/v] Acrylamid, 0,8 % [w/v] Bisacrylamid, Carl Roth (Karlsruhe) |
| APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung | 10 % [w/v] APS in ddH ₂ O |
| Sammelgelpuffer | 1 M Tris HCl pH 6,8 |
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris HCl pH 8,8 |
| SDS (sodium dodecyl sulfate)-Lösung | 10 % [w/v] SDS in ddH ₂ O |
| 5x Proteinprobenpuffer | 50 mM Tris HCl (pH 6,8) 10 % [v/v] Glycerin 2 % [w/v] SDS 0,1 % [w/v] Bromphenolblau (bei reduzierenden Bedingungen zusätzlich 3 % [v/v] β-Mercaptoethanol) |
| SDS-Laufpuffer | 24 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % [w/v] SDS pH 8,3 |

Tabelle 3.2.1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

| | Sammelgel | Trenngel | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Acrylamidkonzentration | 5 % | 7,5 % | 10 % | 12,5 % | 15 % |
| Auftrennungsbereich | | 250 – 50 kDa | 100 - 30 kDa | 75 – 20 kDa | 40 - 10 kDa |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung | 0,67 ml | 2 ml | 2,66 ml | 3,32 ml | 4 ml |
| Sammelgelpuffer | 0,5 ml | | | | |
| Trenngelpuffer | | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| ddH ₂ O | 2,7 ml | 4 ml | 3,32 ml | 2,66 ml | 2 ml |
| 10 % SDS-Lösung | 40 µl | 80 µ | 80 µ | 80 µ | 80 µ |
| 10 % APS-Lösung | 40 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| TEMED | 4 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Je nach Masse der zu detektierenden Proteine wurde ein SDS-

Polyacrylamidgel mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration hergestellt (Tabelle 3.2.1). Die Proben wurden 1:5 mit Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, bevor sie zusammen mit einem Protein-Größenstandard auf das Gel aufgetragen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte unter konstantem Stromfluss bei einer Spannung von 80-120 V. Zur weiteren Analyse der aufgetrennten Proteine wurde entweder eine Coomassie-Färbung (3.2.4) oder eine Immunoblot-Analyse (3.2.5) durchgeführt.

3.2.4. Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

| | |
|---------------------------|--|
| Coomassie Färbe-Lösung | 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure |
| Coomassie Entfärbe-Lösung | 30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure |

Um die Reinheit und molekulare Integrität von aufgereinigten, rekombinanten Proteinen zu überprüfen, wurden diese unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (3.2.3) aufgetrennt und anschließend mit einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbung detektiert. Die im Polyacrylamidgel enthaltenen Proteine wurden über Nacht bei RT mit Coomassie Färbe-Lösung angefärbt. Nach Entfärben des Polyacrylamidgels am nächsten Tag mit Coomassie Entfärbe-Lösung, wurden die Proteinbanden mit dem *infrared imaging system* Li-COR Odyssey detektiert und mit der dazugehörigen Software Odyssey 2.1 analysiert.

3.2.5. Immunoblot-Analyse

| | |
|--------------------------|---|
| Anoden-Puffer I | 300 mM Tris-HCl 20 % [v/v] Ethanol pH 10,4 |
| Anoden-Puffer II | 25 mM Tris-HCl 20 % [v/v] Ethanol pH 10,4 |
| Kathoden-Puffer III | 25 mM Tris-HCl 40 mM 6-Amino-n-Hexansäure 20 % [v/v] Ethanol pH 10,4 |
| TBS-T | 150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 0,05 % TWEEN pH 7,5 |
| <i>Blocking</i> -Puffer | 3 % [w/v] Milchpulver in TBS-T oder 3 % [w/v] BSA in TBS-T |
| <i>Stripping</i> -Puffer | 25 mM Glycin-HCl 1 % [w/v] SDS pH 2.0 |

In Immunoblot-Analysen wurden die durch SDS-PAGE (3.2.3) aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Übertragung der Proteine erfolgte über das *Semi-Dry*-Verfahren. Das Blot-Sandwich wurde folgendermaßen zusammengesetzt: zwei Lagen Whatman-Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer I, zwei weitere Lagen Whatman-Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer II, die in Ethanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Polyacrylamidgel und zuletzt zwei Lagen Whatman-Filterpapier getränkt in Kathoden-Puffer III. Das Blot-Sandwich wurde auf die Kathoden-Platte der *Blotting*apparatur positioniert und eventuell entstandene Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden entfernt. Das *Blotting* der Proteine erfolgte bei 1,5 mA/cm² für 2 h. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT mit *Blocking*-Puffer und anschließend mit der Primärantikörper-Lösung (angesetzt nach Herstellerangaben mit *Blocking*-Puffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit der Sekundärantikörper-Lösung (1:16.000 verdünnt in *Blocking*-Puffer) für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach 3 weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die an die Proteine gebundenen Antikörper detektiert. Bei Immunoblot-Analysen mit HRP (*Horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde für die Detektion Substrat (*Enhanced chemiluminescence*, ECL)-Lösung auf

den Blot gegeben und das durch die Enzymreaktion emittierte Licht mit einem Röntgenfilm detektiert. Bei Immunoblot-Analysen mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde der Blot vor der Detektion zuerst mit TBS gewaschen und danach mit einem *infrared imaging system* Li-COR Odyssey analysiert. Sollte eine Blot mit verschiedenen Primärantikörpern analysiert werden, wurden nach der ersten Immunoblot-Analyse die gebundenen Antikörper durch Inkubation mit *Stripping*-Puffer für 1 h bei RT von der Membran entfernt. Anschließend wurde die Membran erneut blockiert und anschließend mit neuen Primärantikörpern inkubiert.

3.2.6. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Protein-G-Affinitätschromatographie

| | |
|-----------------------|--|
| Auftragspuffer | 20 mM Phosphatpuffer 20 mM Na_2HPO_4 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,0 |
| Elutionspuffer | 100 mM Citratpuffer 100 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 100 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ pH 2,8 |
| Neutralisationspuffer | 1 M Tris pH 9,0 |

Antikörperfusionsproteine mit einem von IgG Molekülen abgeleiteten Fc-Teil wurden mit einer Äkta-FPLC-Anlage (Pharmacia) mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt (4.1). Die Überstände von stabil transfizierten HEK293/anti-PDL1-Fc Zellen (siehe 3.3.5 und 3.3.8) wurden vor der Aufreinigung bei 2500 g für 5 min zentrifugiert und anschließend mit einem PVDF-Membranfilter (Porengröße 0,45 μm , Millipore) filtriert, um unlösliche Präzipitate und Zelltrümmer zu entfernen. Die Protein-G Säule (1 ml Säulenvolumen, Thermo Fisher Scientific) wurde mit 6 ml Auftragspuffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand mit einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Nach dem Waschen mit 6 ml Auftragspuffer wurde der anti-PDL1-Fc Miniantikörper mit 6 ml Elutionspuffer eluiert. Jeweils 2 ml Eluat wurden in bereits mit 0,5 ml Neutralisationspuffer befüllte 5 ml Gefäße fraktioniert. Die Proteinfractionen wurden in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht gegen die 100-fache Menge PBS dialysiert. Am nächsten Tag wurden die Fraktionen in einem Coomassie-Gel auf den Gehalt, die Reinheit und die Integrität des gereinigten Proteins untersucht und die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt (3.2.2).

Methoden

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| Auftragspuffer | 1 M NaCl pH 8,8 |
| Elutionspuffer | 1 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 8,8 |

Die rekombinanten Antikörperfusionsproteine mit einem His₆-Tag am C-Terminus wurden mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie aus den Überständen von stabil transfizierten HEK293 Zellen isoliert (4.1). Schwebstoffe und unlösliche Präzipitate wurden vor der Aufreinigung durch Zentrifugation bei 2500 g für 5 min und anschließender Filtration mit einem PVDF-Membran Filter (Porengröße 0,45 µm, Millipore) aus den Überständen entfernt. Die Ni-NTA Säule (1 ml Säulenvolumen, Cube Biotech) wurde mit 6 ml Auftragspuffer äquilibriert und anschließend mit dem Überstand bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Nach dem Waschen mit 6 ml Auftragspuffer wurden die gebundenen Proteine mit einem Imidazol-Gradienten (2 – 50 % Imidazol) eluiert. Die Eluat-Fractionen wurden über Nacht gegen die 100-fache Menge PBS dialysiert und anschließend in einem Coomassie-Gel auf ihren Proteingehalt analysiert.

3.2.7. Immunpräzipitation

| | |
|------------------------|---|
| PBS-T | 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,67 mM KCl 0,05 % TWEEN pH 7,5 |
| 5x Proteinprobenpuffer | 50 mM Tris HCl (pH 6,8) 10 % [v/v] Glycerin 2 % [w/v] SDS 0,1 % [w/v] Bromphenolblau 3 % [v/v] β-Mercaptoethanol |

Die spezifische Antigen-Bindung des scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc Miniantikörpers wurde durch Immunpräzipitation nachgewiesen (0). 50 µl Protein-G-gekoppelte Dynabeads™ (Invitrogen) wurden mit PBS-T gewaschen und anschließend mit 5 µg gereinigten scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-Protein als

„Fänger“-Antikörper nach Herstellerangaben beladen. Nachdem nicht gebundenes scFv(anti-PD-L1)-IgG4Fc-Protein durch Waschen mit PBS-T entfernt worden war, wurden die Dynabeads mit dem Zelllysate (3.2.1) von PD-L1-positiven A431 Zellen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Dynabeads dreimal mit PBS-T gewaschen, bevor die gebundenen Proteine durch Inkubation mit reduzierendem Proteinprobenpuffer bei 95 °C für 5 min eluiert wurden. Das Eluat wurde anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und eluiertes PD-L1 wurde mittels Immunoblot-Analyse (3.2.3 und 3.2.5) detektiert.

3.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

| | |
|--|------------------------------|
| PBS-T | Siehe 3.2.7 |
| Blockierlösung | 5 % [w/v] Milchpulver in PBS |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung | Thermo-Fisher |

ELISAs wurden durchgeführt, um die Antigen-spezifische Bindung aufgereinigter Antikörperperforationsproteine nachzuweisen. Zudem wurde mittels ELISA die Menge an sekretierten Antikörperperforationsproteinen in Zellkulturüberständen quantifiziert. Eine 96-Well-ELISA-Platte wurde über Nacht mit 100 ng rekombinantem PD-L1-Fc Protein pro Vertiefung (in 100 µl PBS) bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungsstellen mit 300 µl Blockierlösung für 1 h bei RT abgesättigt. Nachdem die Platte dreimal mit 200 µl PBS-T pro Vertiefung mittels einer ELISA-Waschapparatur gewaschen worden war, wurden jeweils 100 µl Proteinstandard oder Probe pro Vertiefung aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 200 µl PBS-T pro Vertiefung) wurden die gebundenen Antikörperperforationsproteine mittels eines Biotin-gekoppelten, Atezolizumab-spezifischen Antikörpers von Genescript (100 ng in 100 µl pro Vertiefung) gebunden. Der Biotin-gekoppelte Antikörper wurde nach erneutem Waschen mit TBS-T (dreimal mit 200 µl pro Vertiefung) mit HRP-gekoppeltem Streptavidin (12,5 ng in 100 µl pro Vertiefung) detektiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden zur Detektion 50 µl TMB-Substratlösung in die Vertiefungen gegeben. Die Enzymreaktion wurde mit 50 µl 1 N Schwefelsäure abgestoppt, und der Farbumschlag in einem Platten-Spektrophotometer (Anthos Reader 2001) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien (2.12) wurden in ihren entsprechenden Medien bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen zwei- bis dreimal die Woche passagiert. Beim Passagieren von adhärenenten Zellen wurden diese zuerst von der Zellkulturflasche gelöst. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und zurückbleibende Proteinreste wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit einer 0,05%igen Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (3.3.2) wurde die gewünschte Menge an Zellen erneut ausgesät. Suspensionszellen wurden direkt geerntet und für 3 min bei 300 g pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen und ein Aliquot der Zellsuspension frisch ausgesät.

3.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Gibco) gemischt. Mit Hilfe einer Einweg-Zählkammer (Kova) wurde die Anzahl der lebenden, Trypanblau-negativen Zellen bestimmt und mit nachfolgender Formel die Zelldichte berechnet.

$$\text{Zelldichte [Zellen/ml]} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl Zählquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

3.3.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für eine dauerhafte Lagerung wurden Säugerzellen kryokonserviert und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen geerntet, in dem entsprechenden Einfriermedium (2.11) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Mit Hilfe einer Kryobox, welche eine optimale Kühlungsrate von -1 °C/min erlaubt, wurden die Zellen in einem -80 °C Gefrierschrank über Nacht auf -80 °C abgekühlt und am nächsten Tag für die weitere Lagerung in einen Stickstofftank überführt. Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese bei 37 °C im

Wasserbad aufgetaut und mit vorgewärmten Medium gewaschen, um restliches DMSO der Einfrierlösung zu entfernen. Danach wurden die Zellen für die Kultivierung in eine Zellkulturflasche mit warmem Kulturmedium überführt.

3.3.4. Bestrahlung von Zellen

Die für die Bestrahlung benötigten Zellen wurden geerntet, gezählt und anschließend in der gewünschten Konzentration und den entsprechenden Zellkulturmedien in ein Reaktionsgefäß befüllt (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Die Zellen wurden in der Biobeam GM 2000 Bestrahlungseinheit (Gamma Service Medical, Leipzig) der gewählten Gammastrahlung bei einer Dosis-Rate von 2,5 Gy/min ausgesetzt. Nach der erfolgten Bestrahlung wurden die Zellen für nachfolgende Experimente verwendet.

3.3.5. Transfektion von Zellen mittels Polyethylenimin

Für die Produktion von lentiviralen VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus Protein-G*)-pseudotypisierten Vektorpartikeln wurden HEK293T Zellen transfiziert. Am Vortag der Transfektion wurden 6×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für 2 h in 5 ml DMEM ohne Zusätze kultiviert, bevor anschließend der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben wurde. Für die Transfektion wurde ein Drei-Plasmid-System verwendet. Jeweils 10 µg Transferplasmid wurden mit 6,5 µg Verpackungsplasmid (pCMVΔR8.91), 3,5 µg Hüllplasmid (pMD2.G) und 80 µl 10 mM 25 kDa linearem Polyethylenimin (PEI, 4 µl PEI pro µg DNA) in 500 µl PBS angesetzt. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert, um die Polyplex-Bildung zwischen DNA und PEI zu gewährleisten, bevor er tropfenweise zu den Zellen gegeben wurde. Nach 4 - 6 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium mit dem Transfektionsansatz von den Zellen abgenommen und durch 10 ml Kulturmedium ersetzt.

Für die Generierung stabil transfizierter Zellen, zur Produktion rekombinanter Antikörperfusionsproteine wurde ähnlich verfahren mit dem Unterschied, dass aufgrund des Antibiotikaresistenzgens HEK239 anstatt HEK293T Zellen verwendet wurden. Außerdem wurden für die stabile Transfektion lediglich 10 ng linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt.

3.3.6. Transduktion von NK-92 Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln

Der Viruspartikel-enhaltende Kulturüberstand wurde 72 h nach Transfektion von den HEK293T Zellen abgenommen und mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,45 µm (Corning) filtriert. Für die Transduktion von NK-92 Zellen wurden 5×10^5 Zellen abzentrifugiert, in 2 ml Virusüberstand aufgenommen und in einer Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen für 90 min in Anwesenheit von 8 µM Polybren und 6 µM des Multi-Kinase-Inhibitors BX795 bei 1800 g und 32 °C zentrifugiert. Nach weiteren 6 h Inkubation bei 37 °C wurden die NK-92 Zellen mittels Zentrifugation geerntet und in frischem X-VIVO⁺⁺ Medium resuspendiert.

3.3.7. Selektion transduzierter NK-92 Zellen

FACS-Puffer

PBS

3 % [v/v] FCS

Mittels *Fluorescence-Activated Cell-Sorting* (FACS) können optisch markierte Zellen, in diesem Fall Zellen, welche das Markerprotein iRFP exprimieren, in einer Mischpopulation detektiert und für die Anreicherung eines transduzierten Zellpools isoliert werden. Eine Woche nach Transduktion mit den lentiviralen Vektorpartikeln wurden die NK-92 Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in sterilfiltriertem FACS-Puffer resuspendiert (mindestens 5×10^6 Zellen, maximal 10^7 Zellen/ml). Nach Vereinzelung der Zellen durch ein Zellsieb wurden am FACSAria Fusion Zellsortierer die erfolgreich-transduzierten, iRFP-positiven Zellen sortiert und anschließend wieder in Kultur genommen. Der Anteil der iRFP-positiven Zellen wurde 7 Tage später erneut per Durchflusszytometrie (3.3.10) bestimmt und bei Bedarf ein zweites Mal mittels des FACSAria Fusion sortiert.

NK-92/5.28.z Zellen, welche mit pS-scFv(anti-PD-L1)-IL-15-IRW, pS-scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15-IRW oder pS-RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1)-IRW transduziert wurden, konnten alternativ durch die Kultivierung in IL-2 freiem Medium (X-VIVO⁺) angereichert werden. Eine Woche nach Transduktion wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und mit X-VIVO⁺ wieder in Kultur genommen. Dabei wurde der Anteil der iRFP-positiven Zellen in regelmäßigen Zeitabständen durchflusszytometrisch (3.3.10) bestimmt.

3.3.8. Proteinproduktion in stabil transfizierten HEK293 Zellen

Für die Produktion von Antikörperfusionsproteinen wurde 3 Tage nach Transfektion mit den pcDNA3-Expressionsplasmiden mit der Selektion von stabil transfizierten HEK293 Zellen begonnen. Die Zellen wurden in Selektionsmedium (DMEM⁺⁺⁺ mit 1 mg/ml G418) kultiviert, bis resistente Zellklone auswuchsen und in Zellkulturflaschen überführt werden konnten. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden diese für die Proteinproduktion in serumfreien Opti-MEM Medium mit 1 mg/ml G418 kultiviert. Die Kulturüberstände wurden über mehrere Wochen ein- bis zweimal pro Woche abgenommen und bei 4 °C für die Proteinaufreinigung gelagert (3.2.6).

3.3.9. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus Buffy-Coats gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Buffy-Coats zuerst 1:2 mit PBS/EDTA (PBS mit 4 mM EDTA) verdünnt. Anschließend wurden 15 ml Biocoll (Biochrom) Lösung mit jeweils 35 ml Probe überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 400 g ohne Bremse wurde die Lymphozytenschicht abgenommen. Die Lymphozyten wurden nach drei Waschschritten mit PBS/EDTA (jeweils 10 min bei RT bei 300, 250 und 200 g,) in 20 ml PBS/EDTA aufgenommen und ihre Zellzahl wurde bestimmt (3.3.2).

3.3.10. Durchflusszytometrische Analysen

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| FACS-Puffer | PBS |
| | 3 % [v/v] FCS |
| Human BD Fc Block™ | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |
| Mouse BD Fc Block™ | BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) |

Mittels Durchflusszytometrie wurden verschiedene Eigenschaften einer Zellpopulation wie Zellgröße, Granularität, Vitalität und auch Proteinexpression auf Einzelzelebene untersucht. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und gefärbt, bevor sie anschließend in FACS-Puffer wiederaufgenommen wurden. Im Durchflusszytometer FACSCanto II

oder LSRTessa (BD Biosciences) wurden die Zellen in einem hydrodynamischen Strom vereinzelt und mit Lasern optisch analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo® v10.

Bestimmung der Transduktionseffizienz

NK-92 Zellen exprimierten nach der Transduktion mit pSIRW-Expressionsvektoren das Markerprotein iRFP. Aufgrund der Fluoreszenz des iRFP konnten die transduzierten NK-92 ohne weitere Färbung in durchflusszytometrischen Analysen identifiziert werden.

Detektion von Oberflächenproteinen

Für die Detektion von Oberflächenproteinen wurden 10^6 zu analysierende Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen, um sie anschließend durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern (Antikörperkonzentration und verwendete Zellzahlen siehe 2.6) für 20 min bei 4 °C zu färben. Fluorochromgekoppelte Antikörper wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS direkt detektiert. Die Antigenbindung von unmarkierten Antikörpern wurde durch eine zweite Färbung mit Spezies-spezifischen, fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern (Antikörperkonzentration und verwendete Zellzahlen siehe 2.6) nachgewiesen. Bei der Färbung von Immunzellen wurde ein Spezies-spezifischer Fc Block™ nach Herstellerangaben zur Antikörperlösung gegeben, um die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren und somit eine Antigen-unabhängige Färbung von Immunzellen zu verhindern.

3.3.11. Zytotoxizitätsassay

| | |
|------------------------------------|---|
| Calcein Violet AM (CV)-Stammlösung | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) 25 µg wurden in 42 µl DMSO resuspendiert |
| Propidium-Iodid (PI)-Lösung | PBS 3 % [v/v] FCS 1 µg/ml Propidium-Iodid |

Die immunstimulierende Wirkung von Immunzytokinen wurde unter anderem in Zytotoxizitätsassays mit PBMCs untersucht. Die PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (3.3.9) isoliert, mit

RPMI⁺⁺⁺ auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die PBMCs wurden über Nacht mit 10 ng/ml murinem IL-12, humanem IL-15 oder den äquimolaren Mengen an aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen stimuliert. Am nächsten Tag wurden verschiedene Tumorzelllinien geerntet, mit RPMI ohne Zusätze gewaschen und für die spätere Identifikation, als Zielzelle im Durchflusszytometer, mit Calcein Violet AM (CV) gefärbt. Hierfür wurden 4×10^6 Zellen in 1 ml RPMI ohne Zusätze mit 1,5 µl Calcein Violet für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit RPMI⁺⁺⁺ gewaschen und mit RPMI⁺⁺⁺ auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 2×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die PBMCs wurden nach der Stimulation geerntet, dreimal mit RPMI⁺⁺⁺ gewaschen und in verschiedenen Mengen, je nach gewünschtem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis, zu den Zielzellen ausgesät. Nach 2 h Coinkubation bei 37 °C wurde der Zytotoxizitätsassay abgestoppt, indem die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen wurden. Für die Identifikation der toten Zellen wurden die Zellen in 150 µl PI-Lösung aufgenommen. Im Durchflusszytometer konnten die toten Zielzellen durch die Doppelfärbung mit CV und PI detektiert werden.

Antikörperfusionsproteine-exprimierende CAR NK-92 Zellen wurden ebenfalls in FACS-basierten Zytotoxizitätsassays analysiert. Hierfür wurden die jeweiligen Zielzellen wie oben beschrieben mit CV gefärbt und in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die NK-92 Zellen wurden ohne weitere Vorstimulation direkt geerntet und anschließend in verschiedenen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen zu den Zielzellen ausgesät. Der Zytotoxizitätsassay wurde ebenfalls nach 2 h abgestoppt, indem die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen wurden. Für die Identifikation der toten Zellen wurden die Zellen in 150 µl PI-Lösung aufgenommen und Durchflusszytometer analysiert.

3.3.12. Proliferationsassay

Der Einfluss der Antikörperfusionsprotein-Expression auf die Proliferation von NK-92 Zellen wurde in Proliferationsassays untersucht. Hierfür wurden die Antikörperfusionsprotein-exprimierenden CAR NK-92 Zellen geerntet und ihre Zellzahl bestimmt (3.3.2). Die Zellen wurden dreimal mit X-VIVO⁺⁺ gewaschen und anschließend auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden jeweils 6 Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit 200 µl Zellsuspension mit 2×10^4 CAR NK-92 Zellen befüllt. Die Zellen wurden für 6 Tage kultiviert, wobei alle 24 h die Zellen aus einer Vertiefung geerntet und die Zellzahlen bestimmt wurden (3.3.2). Nach 3 Tagen wurde in die verbleibenden Vertiefungen jeweils 100 µl frisches Medium gegeben. Das veränderte Volumen ab Tag 3 wurde bei der Berechnung der Zellzahlen mit einem Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

Für Proliferationsanalysen in Abwesenheit von IL-2 wurde ähnlich verfahren mit dem Unterschied, dass die CAR NK-92 Zellen mit X-VIVO⁺ (supplementiert mit humanem Plasma, ohne IL-2) gewaschen und anschließend ausgesät wurden. An Tag 3 wurde ebenfalls 100 µl frisches X-VIVO⁺ in die verbleibenden Vertiefungen gegeben.

Die Verdoppelungszeit T_d der CAR NK-92 Zelllinien wurde mit der nachfolgenden Formel berechnet, wobei n_1 die bestimmte Zellzahl zum Zeitpunkt t_1 und n_2 die ermittelte Zellzahl zum Zeitpunkt t_2 darstellt:

$$T_d = (t_2 - t_1) \cdot \frac{\ln(2)}{\ln(\frac{n_2}{n_1})}$$

3.3.13. Gemischte Lymphozytenreaktion

CellTrace™ CFSE
(Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)

Thermo Fisher Scientific
5 mM in DMSO

Die Funktionalität der Antikörperfusionsproteine als *Immune Checkpoint*-Inhibitoren wurde in einer gemischten Lymphozytenreaktionen (GLR) untersucht. In GLRs können Peptide und auch niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, welche die T-Zellaktivierung beeinflussen. Das Funktionsprinzip einer GLR basiert auf der Eigenschaft von T-Zellen, Zellen eines anderen Individuums in einer Alloreaktion als fremd zu erkennen. T-Zellen können mittels ihres T-Zellrezeptors bestimmte, fremde MHC-Peptid-Komplexe erkennen und binden. Die Bindung des T-Zellrezeptors und weiterer costimulatorischer Rezeptoren, wie zum Beispiel CD28, löst in T-Zellen die Aktivierung aus. Die aktivierten T-Zellen beginnen zu proliferieren und zu T-Effektorzellen zu differenzieren. Anhand der Proliferationsrate wird in den GLRs die T-Zellaktivierung bestimmt. Immunstimulatorische Zytokine oder auch Antikörper, die als *Immune Checkpoint*-Inhibitoren wirken, können die T-Zellaktivierung verstärken und dadurch die Proliferationsrate steigern. Die Proliferation der T-Zellen wird in GLRs anhand des fluoreszierenden Zellfarbstoffs Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) verfolgt. CFSE ist ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, welcher in der Zelle kovalent an freie Amine bindet und dadurch über lange Zeiträume stabil in der Zelle verbleibt. Während der Zellteilung werden die CFSE-Moleküle zusammen mit den an ihnen gebundenen Proteinen auf die Tochterzellen aufgeteilt. Die Menge an CFSE-Molekülen pro Zelle nimmt mit jeder Zellteilung weiter ab, wodurch proliferierende Zellen durch eine verringerte CFSE-Färbung im Vergleich zu ruhenden Zellen identifiziert werden können.

Für die GLRs wurden PBMCs von zwei verschiedenen Spendern isoliert (3.3.9). Die PBMCs eines Spenders wurden als Effektorzellen verwendet und mit CFSE nach Herstellerangaben gefärbt. Als Stimulatorzellen wurden CD3-negative Lymphozyten und Monozyten des zweiten Spenders verwendet. Die CD3-negativen Zellen wurden nach Herstellerangaben mittels eines T-Zell Isolation-Kits (StemCell) isoliert, anschließend mit 25 Gy bestrahlt und ihre Zellzahl wurde bestimmt (siehe 3.3.2 und 3.3.4). Nach der Bestrahlung wurden Stimulator- und Effektorzellen im Verhältnis 1:1 (jeweils 150.000 Zellen) in insgesamt 200 µl in X-VIVO⁺⁺ Medium pro Vertiefung in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Antikörperfusionsproteinen für 7 Tage kultiviert. Effektorzellen kultiviert ohne Stimulatorzellen dienten als Negativkontrolle für die T-Zellrezeptor-induzierte Proliferation. Nach einer Woche wurde die GLR abgestoppt, indem die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden für die FACS-Analyse mit einem CD8-APC Antikörper gefärbt (1,25 µl pro Probe), wodurch die CD8⁺ T-Zellen als CFSE/APC doppelt positive Zellpopulation identifiziert wurden. Proliferierende T-Zellen wurden als APC-positiv Zellen mit verringerten CFSE-Signal bestimmt.

3.3.14. Transwell-Experimente

Die Stimulation von benachbarten Immunzellen durch von CAR NK-92 Zellen sekretierte Antikörperfusionsproteine, wurde in Transwell-Experimenten untersucht. Durch die Verwendung von Transwell-Zellkultureinsätzen (Porengröße 0,4 µm) können verschiedene Zellpopulationen in demselben Medium, aber räumlich getrennt kultiviert werden. Während die verschiedenen Zellpopulationen keinen direkten Kontakt haben, können lösliche Moleküle wie auch die sekretierten Antikörperfusionsproteine, die Membran der Transwell-Einsätze passieren und die benachbarten Zellen stimulieren.

Um die Konzentration der Antikörperfusionsproteine während der Transwell-Experimente zu erhöhen, wurden die Assays in konditionierten X-VIVO⁺⁺ angesetzt, welches bereits mit sekretierten Antikörperfusionsproteinen angereichert wurde.

Transwell-Zytotoxizitätsassay

Zellkultureinsätze
(ThinCERT™ Cell Culture Inserts)
Propidium-Iodid (PI)-Lösung

Greiner Bio-One (Österreich)

PBS
3 % [v/v] FCS
1 µg/ml Propidium-Iodid

Drei Tage vor Beginn des Transwell-Experiments wurden 6×10^6 Antikörperfusionsproteine-exprimierende CAR NK-92 Zellen in 6 ml X-VIVO⁺⁺ ausgesät. An Tag 0 wurden die NK-92 Zellen für den Transwell-Versuch geerntet und das mit den sekretierten Antikörperfusionsproteinen angereicherte, konditionierte Medium abgenommen. Als Effektorzellen für den Transwell-Zytotoxizitätsassay wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert (3.3.9) und in einer 24-Well-Platte ausgesät (pro Vertiefung $2,4 \times 10^6$ PBMCs in 1 ml konditioniertem X-VIVO⁺⁺). Die geernteten CAR NK-92 Zellen wurden in die Transwell-Einsätze erneut ausgesät (pro Ansatz 3×10^5 Zellen in 300 µl konditioniertem X-VIVO⁺⁺) und über Nacht mit den PBMCs kokultiviert. Als Kontrollen wurden PBMCs in einer 24-Well-Platte mit frischem Medium ausgesät (pro Vertiefung $2,4 \times 10^6$ PBMCs in 1 ml X-VIVO⁺⁺) und über Nacht mit murinem IL-12 (10 ng/ml), humanem IL-15 (10 ng/ml) oder den äquimolaren Mengen an aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen stimuliert. An Tag 1 wurden K562 Zellen wie in 3.3.11 beschrieben für die Verwendung als Zielzelllinie für den Transwell-Zytotoxizitätsassay mit Calcein Violet gefärbt und in einem Verhältnis von 1:20 zu den PBMCs ausgesät. Nach 2 h Kokultivierung wurde der Transwell-Zytotoxizitätsassay abgestoppt, indem die Zellsuspension aus PBMCs und K562 Zellen geerntet und mit PBS gewaschen wurde. Für die Identifikation der abgetöteten Zielzellen wurde die Zellsuspension mit PI-Lösung gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer als CV/PI doppelt positive Zellen bestimmt. Die Transwell-Einsätze mit den Antikörperfusionsproteine-exprimierenden NK-92 Zellen wurden verworfen.

Transwell-Gemischte Lymphozytenreaktion (GLR)

Zellkultureinsätze
(ThinCERT™ Cell Culture Inserts)
CellTrace™ CFSE

Greiner Bio-One (Österreich)
Thermo Fisher Scientific

Drei Tage vor Beginn des Transwell-Experiments wurden 6×10^6 Antikörperfusionsproteine-exprimierende CAR NK-92 Zellen in 6 ml X-VIVO⁺⁺ ausgesät. An Tag 0 wurden die CAR NK-92 Zellen für den Transwell-Versuch geerntet und das mit den sekretierten Antikörperfusionsproteinen angereicherte, konditionierte Medium abgenommen. Die geernteten CAR NK-92 Zellen wurden in einer 24-Well-Platte erneut ausgesät (pro Vertiefung 3×10^5 Zellen in 1 ml konditioniertem X-VIVO⁺⁺). Für die gemischte Lymphozytenreaktion (GLR) wurden PBMCs von zwei gesunden Spendern isoliert und wie in 3.3.13 beschrieben für die Reaktion vorbereitet. Es wurden $1,5 \times 10^5$ Effektor- und Stimulatorzellen in 300 µl konditioniertem X-VIVO⁺⁺ angesetzt und in die Transwell-Einsätze ausgesät. Die Transwell-Einsätze mit den GLRs wurden in die, bereits mit den entsprechenden Antikörperfusionsproteine-exprimierenden CAR NK-92 Zellen befüllten, Vertiefungen der 24-Well-Platte eingesetzt. Die PBMCs und CAR NK-92 Zellen wurden durch die Transwell-Einsätze räumlich abgetrennt für 4 Tage kokultiviert. An Tag 1 wurden weitere Antikörperfusionsprotein-exprimierende CAR NK-92 Zellen ausgesät (6×10^6 Zellen in 6 ml X-VIVO⁺⁺) und für 3 Tage kultiviert, um das Medium mit sekretierten Antikörperfusionsproteinen anzureichern. An Tag 4 wurden die CAR NK-92 Zellen für den Transwell-Versuch geerntet und mit dem konditionierten Medium in einer 24-Well-Platte erneut ausgesät (pro Vertiefung 3×10^5 Zellen in 1 ml konditioniertem X-VIVO⁺⁺). Die Transwell-Einsätze mit den PBMCs wurden in die Vertiefungen der frisch vorbereiteten 24-Well-Platte, mit den entsprechenden Antikörperfusionsproteine-exprimierenden CAR NK-92 Zellen, umgesetzt und für weitere 3 Tage kultiviert. Die erste 24-Well-Platte mit den Antikörperfusionsproteine-exprimierenden CAR NK-92 Zellen wurde verworfen. Nach 7 Tagen wurde die Transwell-GLR abgestoppt, indem die PBMCs aus den Transwell-Einsätzen geerntet und mit PBS gewaschen wurden. Die PBMCs wurden mit einem CD8-APC Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die proliferierenden CD8⁺ T-Zellen konnten im Durchflusszytometer aufgrund ihrer abnehmenden CFSE-Färbung detektiert werden. Als Kontrollen wurden GLRs mit frischem Medium angesetzt und mit murinem IL-12 (10 ng/ml), humanem IL-15 (10 ng/ml) oder den äquimolaren Mengen an aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen stimuliert. Als weitere Negativkontrolle für die T-Zellrezeptor-induzierte Proliferation wurden Effektorzellen ohne Stimulatorzellen kultiviert.

3.4. *In vivo* Experimente

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt (Gen. Nr. F123/1033), gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.4.1. Haltung von immunkompetenten Mäusen

Die verwendeten C57BL/6 Mäuse wurden in der Tierversuchseinrichtung des Georg-Speyer-Hauses, in Makrolonkäfigen mit Filterhaube, in Gruppengrößen von mindestens zwei bis maximal fünf Tieren gehalten. Die Haltung erfolgte in einem 12 h Hell/Dunkel-Zyklus bei 22 °C und 55 % relativer Luftfeuchte. Futter und Wasser erhielten sie *ad libitum*. Der Käfigwechsel erfolgt einmal wöchentlich, bei Bedarf öfter.

3.4.2. Induktion und Behandlung syngener GL261/ErbB2 Tumoren

In die rechte Flanke von sechs Wochen alten, weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden 1×10^6 GL261/ErbB2 Tumorzellen (resuspendiert in 100 µl 1x DPBS) subkutan verabreicht. 22 Tage nach Tumorinokulation wurden die Mäuse durch peritumorale Injektion von 100 µl X-VIVO⁺⁺, von 1×10^7 parentalen ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z oder NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen (jeweils resuspendiert in 100 µl X-VIVO⁺⁺) behandelt. Die Behandlung wurde zweimal wöchentlich für insgesamt vier Wochen durchgeführt. Während des Versuchs wurden die Tiere regelmäßig gewogen, der Allgemeinzustand beurteilt und das Tumorzellen anhand einer Schiebelehre ermittelt. Tiere, deren Tumor einen Durchmesser von annähernd 1,5 cm erreichte, einen Gewichtsverlust von über 20 %, oder sonstige Gesundheits- und Verhaltensauffälligkeiten aufwiesen, wurden unter Isofluran-Narkose durch zervikale Dislokation euthanisiert.

3.5. Statistische Analysen

Sofern nicht anders beschrieben, sind alle in dieser Arbeit aufgeführten Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten angegeben. Bei Experimenten mit primären Zellen wurde aufgrund der Donorvariabilität eine *block shift*-Korrektur durchgeführt, bevor anschließend die Mittelwerte \pm SD berechnet wurden.

$$X'_n = X_n - (Y_n - \bar{Y})$$

X'_n ist der korrigierte Wert X von Experiment n . \bar{Y} stellt den Mittelwert der X -Werte aus allen Experimenten dar, während Y_n der Mittelwert der technischen Replikate eines Experiments n ist.

Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe der Software Prism 7.02 (GraphPad, La Jolla USA) berechnet. Es wurde ein one-way Anova mit anschließendem Tukey's multiple comparison test angewendet. Um Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven von den C57BL/6 Mäusen zu beurteilen, wurde der Log-Rank-Test eingesetzt. Als statistisch signifikant wurden hierbei p-Werte von $< 0,05$ befunden. Die in dieser Arbeit berechneten Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

Solide Tumoren sind aufgrund verschiedener Eigenschaften wie der heterogenen Antigenexpression oder auch der Ausbildung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung weniger empfänglich gegenüber der immuntherapeutischen Behandlung mit CAR-Effektorzellen als hämatologische Malignitäten (Martinez und Moon, 2019). CAR-Zellen der 4. Generation stellen eine Erweiterung des aktuellen CAR-Konzepts dar, in welchem die CAR-Effektorzellen mit weiteren Transgenen wie zum Beispiel proinflammatorischen Zytokinen oder auch immunmodulierenden Antikörpern ausgestattet werden, um die immunsuppressiven Effekte der Tumormikroumgebung umkehren und endogene Immunzellen zu einer Antitumorreaktion rekrutieren zu können (Yeku und Brentjens, 2016).

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung solcher neuartigen CAR-Zellen basierend auf der zytotoxischen CAR NK-Zelllinie NK-92/5.28.z, welche spezifisch das tumorassoziierte Antigen ErbB2 (HER2) erkennt. Die ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen wurden mit verschiedenen PD-L1-spezifischen Immunzytokinen, die als *Immune Checkpoint*-Inhibitor wirken und mithilfe der Zytokindomäne umgebende endogene Immunzellen stimulieren können, modifiziert (Abbildung 1.5). Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen PD-L1-spezifischen Immunzytokine entwickelt, in stabil transfizierten HEK293 Zellen produziert und anschließend auf ihre Funktionalität überprüft, bevor sie im zweiten Teil dieser Arbeit für die Herstellung von CAR NK-92 Zellen der 4. Generation verwendet wurden.

4.1. Generierung und biochemische Charakterisierung PD-L1-spezifischer Immunzytokine

4.1.1. Rekombinante Expression und Reinigung PD-L1-spezifischer Antikörperfusionsproteine

Bei der Entwicklung der Immunzytokine wurde darauf geachtet, dass diese sowohl in *in vitro* Versuchen mit humanen Immunzellen als auch in *in vivo* Studien mit murinen Zellen funktional sind. So bindet das in den Immunzytokinen enthaltene scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von dem *Immune Checkpoint*-Inhibitor Atezolizumab (Tecentriq®, Genentech/Roche), sowohl an humanes als auch an murines PD-L1 (Chatterjee et al., 2016; Irving, 2012). Innerhalb der Immunzytokine sind die variablen Domänen der

schweren und leichten Antikörperketten, V_H und V_L , im scFv-Antikörperfragment über einen GS-*Linker* miteinander verbunden. Über einen weiteren *Linker* ist je nach Antikörperkonstrukt eine Zytokindomäne an den C-Terminus oder den N-Terminus des scFv-Fragments gekoppelt. Das Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-scIL-12 (abgekürzt anti-PDL1-scIL12) enthält, verknüpft über eine von IgG abgeleitete *hinge*-Region am C-Terminus der V_L -Domäne, ein murines IL-12-Molekül im Einzelkettenformat (engl. *single chain IL-12*, scIL-12) (Abbildung 4.1, B). Murines IL-12 kann im Gegensatz zu dem humanen Zytokin sowohl den murinen als auch den humanen IL-12-Rezeptorkomplex aktivieren. Durch die Verwendung von rekombinantem scIL-12, in welchem die zwei Untereinheiten von IL-12 (p40 und p35) durch einen GS-*Linker* verbunden sind, wird die Heterodimerbildung und dadurch die korrekte Proteinfaltung des Zytokins begünstigt. Das Immunzytokin scFv(anti-PD-L1)-IL-15 (abgekürzt anti-PDL1-IL15) ist ähnlich wie anti-PDL1-scIL12 aufgebaut mit dem Unterschied, dass über eine von IgG abgeleitete *hinge*-Region ein humanes IL-15-Molekül an die Antikörperdomäne gekoppelt ist (Abbildung 4.1, C). Humanes IL-15 aktiviert ebenfalls sowohl den humanen als auch den murinen IL-15-Rezeptorkomplex und ist dadurch auch für die Verwendung in Mausmodellen geeignet. Zwei weitere Immunzytokine, scFv(anti-PD-L1)-RD-IL-15 und RD-IL-15-scFv(anti-PD-L1) (abgekürzt anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1), enthalten einen IL-15-Superagonisten als Zytokindomäne (Abbildung 4.1, D-E).

Der IL-15-Superagonist besteht aus einer humanen IL-15-Mutante, welche an Aminosäureposition 72 anstatt Asparagin Asparaginsäure enthält (IL-15_{N72D}). Zusätzlich ist die IL-15-Mutante am N-Terminus über einen GS-*Linker* mit einem kurzen Fragment des IL-15-Rezeptors α , der sogenannten Sushi-Domäne (Aminosäuren 31-107, IL15R α_{31-107}), verbunden. Durch diese zwei Modifikationen weist der IL-15-Superagonist im Vergleich zu IL-15 eine erhöhte Affinität zu dem *intermediate-affinity* IL-15-Rezeptor auf, während die Bindung zum *high-affinity* IL-15-Rezeptor nicht beeinflusst wird (Mortier et al., 2006; Zhu et al., 2009). Im Antikörperfusionsprotein anti-PDL1-RD-IL15 ist die Sushi-Domäne des IL-15-Superagonisten über einen GS-*Linker* mit dem C-Terminus des anti-PD-L1 scFv-Fragments verbunden. Das Antikörperfusionsprotein RD-IL15-anti-PDL1 enthält den IL-15-Superagonisten am N-Terminus des Proteins, über einen GS-*Linker* gekoppelt an die V_H -Domäne des Antikörperfragments. Alle vier generierten Immunzytokine enthalten jeweils am N-Terminus ein Signalpeptid abgeleitet von einer schweren IgG Kette, welches die Sekretion des Proteins vermittelt und später abgespalten wird, sowie am C-Terminus einen HA- und His₆-*Tag* zur Detektion und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.

Als Kontrollprotein wurde ein weiteres Antikörperfusionsprotein entwickelt, welches anstatt eines immunstimulatorischen Zytokins einen von IgG4 abgeleiteten Fc-Teil enthält (Abbildung 4.1, A). Bei der Konstruktion dieses Antikörpermoleküls wurden die konstanten Domänen der schweren

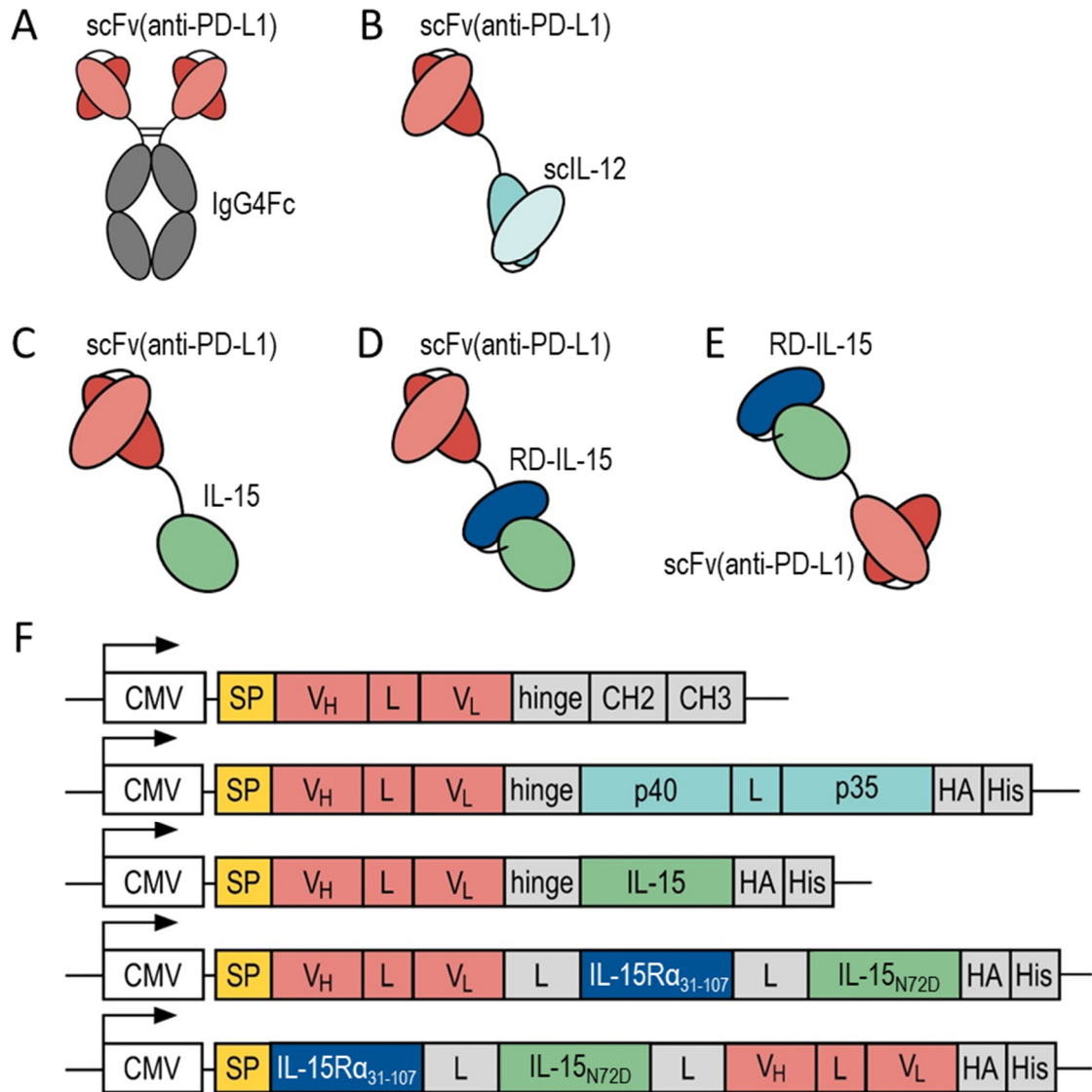


Abbildung 4.1: **Rekombinante PD-L1-spezifische Antikörperperforationsproteine.** **(A-E)** Die generierten Antikörperkonstrukte enthalten dasselbe scFv-Antikörperfragment, abgeleitet von den variablen Domänen der leichten und schweren Antikörper-Ketten V_H und V_L des PD-L1-spezifischen Antikörpers Atezolizumab. **(A)** Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper enthält, gekoppelt über eine von IgG1 abgeleitete *hinge*-Region, die konstanten Domänen CH₂ und CH₃ der schweren Antikörper-Kette eines humanen IgG4 Antikörpers. **(B)** Das Immunzytokin anti-PDL1-scIL12 enthält, gekoppelt über eine von abgeleitete IgG *hinge*-Region, ein rekombinantes murines IL-12 Einzelkettenfragment (scIL-12). Die zwei Untereinheiten von IL-12, p35 und p40, sind über einen GS-Linker miteinander verbunden. **(C)** Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 enthält, gekoppelt über eine von IgG abgeleitete *hinge*-Region, humanes IL-15. **(D)** Das Immunzytokin anti-PDL1-RD-IL15 enthält am C-Terminus einen IL-15-Superagonisten (RD-IL-15), welcher aus einer IL-15-Mutante (IL-15_{N72D}) und der Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptors α (IL-15Rα₃₁₋₁₀₇) besteht. Das scFv-Fragment und der IL-15-Superagonist sind über einen GS-Linker verbunden. **(E)** Das Immunzytokin RD-IL15-anti-PDL1 enthält gekoppelt über einen GS-Linker eine IL-15-Superagonist-Domäne am N-Terminus. **(F) Schematische Darstellung der Expressionsplasmide zur Expression der Antikörperperforationsproteine.** Alle in dieser Arbeit generierten Antikörperperforationsproteine wurden mithilfe des eukaryotischen Expressionsplasmids pcDNA3 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors in stabil transfizierten HEK293 Zellen exprimiert. CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, L: GS-Linker, hinge: IgG abgeleitete *hinge*-Region, HA: HA-Tag, His: His₆-Tag.

Antikörperkette C_H2 und C_H3 über eine von IgG1 abgeleitete *hinge*-Region an den C-Terminus des scFv-Fragments fusioniert. Im Vergleich zu einem IgG-Antikörper fehlen dem rekombinanten Antikörperkonstrukt somit die konstanten Domänen C_H1 und C_L. Aufgrund dieses verkürzten Designs wird ein solches Antikörperkonstrukt auch als Miniantikörper bezeichnet. Da der immunregulatorische Ligand PD-L1 kein tumorspezifisches Antigen ist, sondern auch von Epithelzellen oder Immunzellen nach der Stimulation mit IFN γ oder TNF α exprimiert wird, wurde für die Generierung des Miniantikörpers der Fc-Teil eines IgG4-Antikörpers genutzt. Humane IgG4-Antikörper lösen im Gegensatz zu anderen IgG-Subklassen kaum Fc-vermittelte Antikörperfunktionen, wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) oder die komplementabhängige Zytolyse (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC) aus, wodurch die Depletion von PD-L1-positiven Immunzellen verhindert wird. Da der Miniantikörper über den Fc-Teil detektiert und aufgereinigt werden kann, wurde in dem Miniantikörper-Konstrukt auf His₆- und HA-Tags verzichtet. Der in anti-PDL1-Fc enthaltene Fc-Teil vermittelt über Disulfidbrücken in der *hinge*-Region die Homodimerisierung des Miniantikörpers, wodurch die bivalente Bindung an PD-L1 möglich ist. Die Immunzytokine anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-sclL12 enthalten als *Linker* zwischen scFv-Fragment und Zytokindomäne eine von IgG1 abgeleitete modifizierte *hinge*-Region, welche nach Angaben einer Patentveröffentlichung (EP 1 418 184 A1, A. Hombach, 08.11.2002) durch Deletion der ansonsten enthaltenen Cystein-Reste die Homodimerisierung der Immunzytokine ausschließt.

Um die Antikörperfusionsproteine in HEK293 Zellen produzieren zu können, wurden zunächst die entsprechenden Antikörperfusionsprotein-kodierenden DNA-Sequenzen *de novo* synthetisiert und in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 eingebracht (Abbildung 4.1, F). In den pcDNA3-Expressionsplasmiden werden die Antikörperkonstrukte unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV)-Promotors konstitutiv exprimiert. Zusätzlich enthalten die Plasmide ein Geneticin (G418)-Resistenzgen, welches unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors konstitutiv exprimiert wird und für die positive Selektion von transfizierten Zellen genutzt werden kann. Die pcDNA3-Expressionsplasmide wurden mit dem Restriktionsenzym PvuI verdaut (schneidet einfach innerhalb des Ampicillinresistenzgens) und nach der gelelektrophoretischen Auftrennung als linearisierte Plasmide isoliert. Anschließend wurden die linearisierten pcDNA3-Expressionsplasmide für die stabile Transfektion von HEK293 Zellen mittels PEI verwendet. Drei Tage nach Transfektion wurden die HEK293 Zellen zur Selektion stabil transfizierter Zellen in Selektionsmedium (DMEM⁺⁺⁺ mit 1 mg/ml G418) überführt. Die so generierten stabil transfizierten Zellpools wurden für die anschließende Antikörperproduktion in serumfreiem Opti-MEM Medium mit 1 mg/ml G418 kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden die Kulturüberstände mit den sekretierten

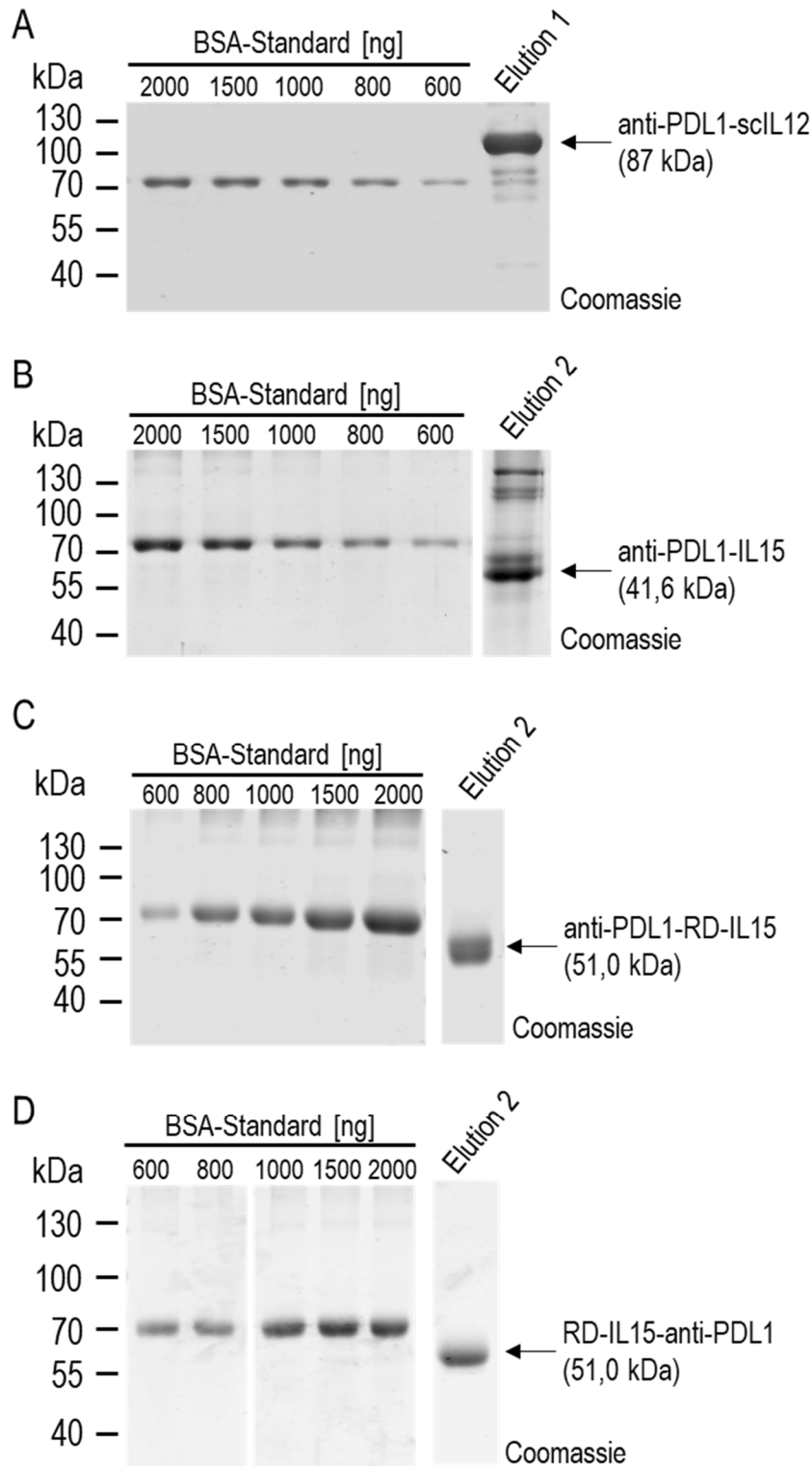


Abbildung 4.2: **Aufreinigung von Antikörperperfusionsproteinen mit integriertem His₆-Tag.** Aus dem Überstand stabil transfizierter HEK293 Zellen wurden die sekretierten Antikörperperfusionsproteine über den enthaltenen His₆-Tag mit einer Ni-NTA Säule aufgereinigt. Die Eluat-Fractionen wurden über Nacht per Dialyse in PBS umgepuffert und am nächsten Tag in einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung untersucht. Die Identität der eluierten Proteine wurde anhand der molekularen Massen der detektierten Proteinbanden bestimmt. Die Konzentrationen der eluierten Antikörperperfusionsproteine wurden mittels einer BSA-Standardreihe ermittelt. Proteinaufreinigung von anti-PDL1-sclL12 (**A**), anti-PDL1-IL15 (**B**), anti-PDL1-RD-IL15 (**C**), RD-IL15-anti-PDL1 (**D**). Gezeigt ist jeweils die Eluatfraktion mit der höchsten Proteinkonzentration.

Ergebnisse

Antikörperperfusionsproteinen gesammelt und bis zur Proteinaufreinigung bei 4 °C gelagert. Über den enthaltenen His₆-Tag wurden die sekretierten Immunzytokine, mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) aus den Zellkulturüberständen isoliert. Die Eluat-Fractionen wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung untersucht (Abbildung 4.2). Nach der IMAC wurde in jeweils mindestens einer der Eluatfraktionen eine Proteinbande mit der erwarteten molekularen Masse des aufgereinigten Immunzytokins (unter Berücksichtigung der Proteinglykosylierungen) detektiert. Während bei der Aufreinigung des Immunzytokins RD-IL15-anti-PDL1 nur eine Proteinbande vorlag, wurden in den Eluatfraktionen der anderen Immunzytokine anti-PDL1-sclL12, anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-RD-IL15 noch diverse weitere Proteinbanden detektiert. Diese zusätzlichen Proteinbanden weisen auf mögliche Proteinverunreinigungen, auf Abbauprodukte der Immunzytokine oder auch auf unterschiedliche Glykosylierung der Proteine hin. Die Konzentrationen der eluierten Proteine wurden im Vergleich zu einer BSA-Standardreihe ermittelt und lagen zwischen 56 µg/ml und 320 µg/ml beziehungsweise zwischen 1,1 µM und 4,8 µM (Tabelle 4.1.1).

Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde im Gegensatz zu den Immunzytokinen über die enthaltene Fc-Domäne mittels Protein-G-Affinitätschromatographie isoliert. Die eluierten Proteinfractionen wurden in einem reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung untersucht (Abbildung 4.3). In den Eluatfraktionen wurde eine Proteinbande mit einer molekularen Masse von etwa 55 kDa detektiert. Dies entspricht der erwarteten molekularen Masse des nach Reduktion als Monomer vorliegenden Miniantikörpers (unter Berücksichtigung der Glykosylierungen). Zusätzlich wurde eine zweite höhermolekulare Bande detektiert, welche auf mögliche

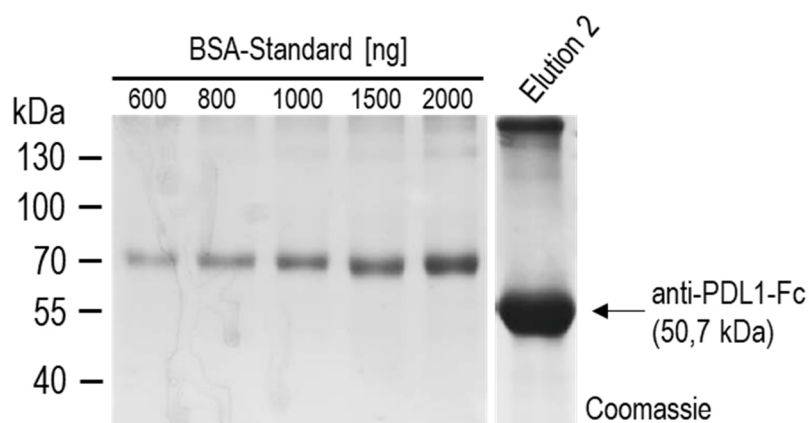


Abbildung 4.3: **Aufreinigung des Miniantikörpers anti-PDL1-Fc.** Der PD-L1-spezifische Miniantikörper anti-PDL1-Fc wurde mit einer Protein-G-Affinitätssäule aus dem Überstand stabil transfizierter HEK293/anti-PDL1-Fc Zellen isoliert. Die Eluate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung untersucht. Die Konzentration des eluierten Antikörpers wurde im Vergleich zu einer BSA-Standardreihe bestimmt. Gezeigt ist die Eluatfraktion mit der höchsten Proteinkonzentration.

Ergebnisse

Proteinverunreinigungen oder auch auf Proteinkomplexe hinweist. Die ermittelte Konzentration des eluierten Proteins betrug 700 µg/ml. Ausgehend von einer erwarteten molekularen Masse von 50,7 kDa entspricht dies bezogen auf das Homodimer des Miniantikörpers einer Konzentration von 3,45 µM (Tabelle 4.1.1).

Tabelle 4.1.1: Molekulare Massen und Konzentrationen der gereinigten Antikörperfusionsproteine. Die rekombinanten Antikörperfusionsproteine wurden in stabil transfizierten HEK293 Zellen produziert. Die Immunzytokine wurden über den enthaltenen His₆-Tag mittels IMAC aus den Zellkulturüberständen der HEK293 Zellen isoliert. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde über den Fc-Teil mithilfe von Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Konzentrationen der eluierten Proteine wurden jeweils im Vergleich zu einer BSA-Standardreihe ermittelt.

| Antikörperfusionsprotein | Berechnete molekulare Masse[kDa] | Konzentration [µg/ml] | Konzentration [µM] |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| anti-PDL1-scIL12 | 87,3 | 320 | 3,67 |
| anti-PDL1-IL15 | 41,6 | 200 | 4,8 |
| anti-PDL1-RD-IL15 | 51,0 | 68,2 | 1,34 |
| RD-IL15-anti-PDL1 | 51,0 | 56,1 | 1,1 |
| anti-PDL1-Fc | 50,7 (Monomer) 101,4 (Dimer) | 700 | 6,9 (Monomer) 3,45 (Dimer) |

4.1.2. Biochemische Charakterisierung der isolierten Antikörperfusionsproteine

Nach der Produktion und Aufreinigung der Antikörperfusionsproteine wurde zunächst die Identität der Moleküle bestätigt. Hierfür wurden jeweils 22 pmol der eluierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot mittels verschiedener Antikörperfärbungen analysiert (Abbildung 4.4). Als Positivkontrollen wurden zusätzlich in weiteren Spuren Atezolizumab, rekombinantes IL-12 und IL-15 elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Färbung mit einem antiidiotypischen, gegen Atezolizumab gerichteten Antikörper konnten alle fünf Antikörperfusionsproteine in den Eluaten, sowie die schwere Antikörperkette (50 kDa) von Atezolizumab detektiert werden (Abbildung 4.4, A). Ähnlich wie in den zuvor durchgeführten Coomassie-Färbungen (Abbildung 4.2) waren auch bei der Immunoblot-Analyse in den Eluat-Fractionen von anti-PDL1-scIL12, anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-RD-IL15 mehrere Proteinbanden mit geringerer molekularen Masse detektierbar, welche auf mögliche Abbauprodukte der Antikörperfusionsproteine oder auch auf unvollständig glykosylierte Proteine hinweisen. Mit einem

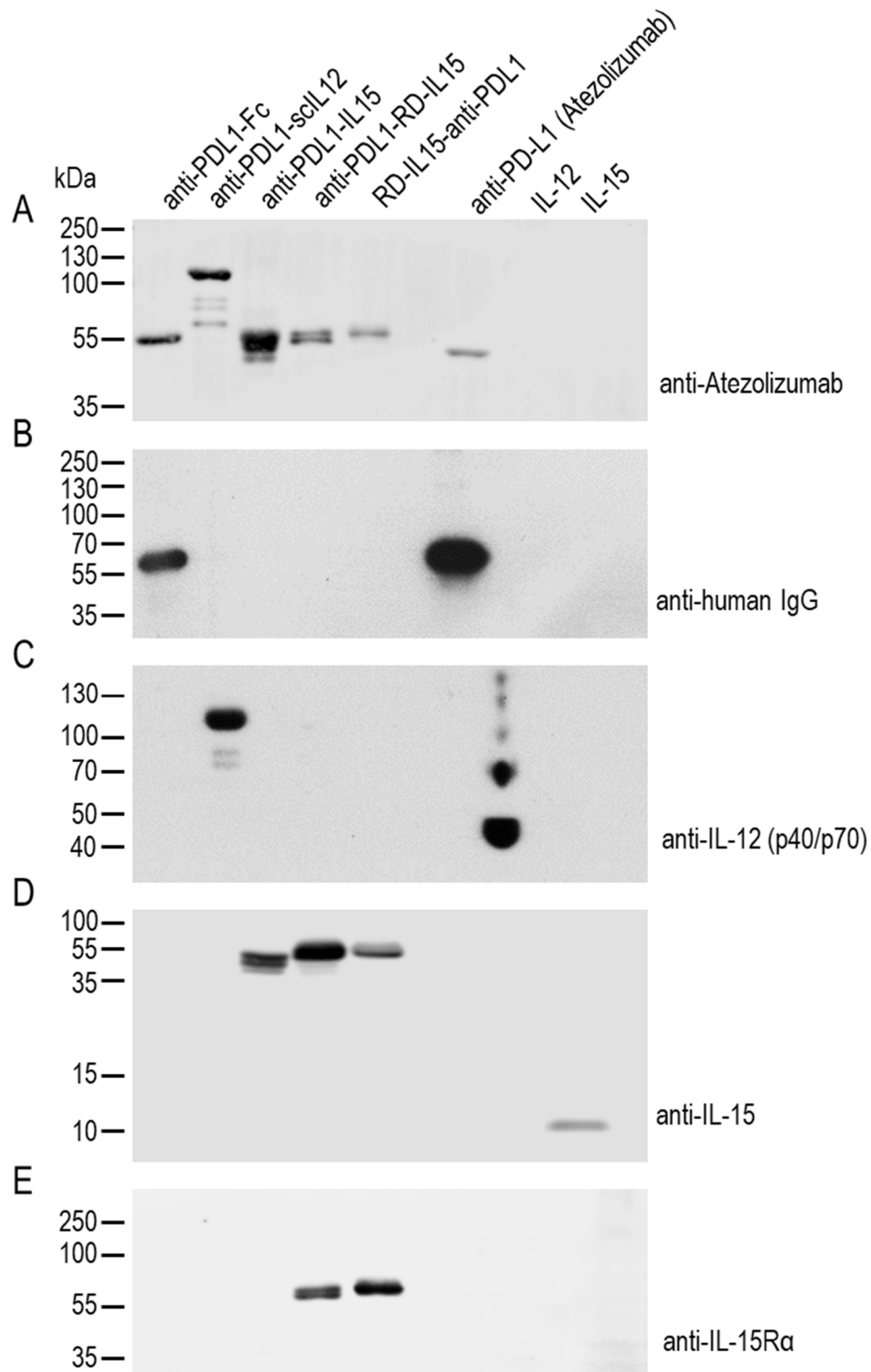


Abbildung 4.4: **Nachweis der Integrität der isolierten Antikörperperfusionsproteine mittels Detektion der enthaltenen Zytokin- und Antikörperdomänen.** Jeweils 22 pmol der Antikörperperfusionsproteine und der Kontrollproteine Atezolizumab, IL-12 und IL-15 wurden in Immunoblot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für Atezolizumab (A), humanes IgG-Fc (B), murines IL-12 (p40/p70) (C), humanes IL-15 (D) oder den humanen IL-15-Rezeptor α (E) untersucht. Der HRP-gekoppelte anti-human IgG Antikörper wurde direkt durch Inkubation mit einem chemilumineszenten HRP-Substrat detektiert. Der IL-12-spezifische Antikörper wurde mithilfe eines HRP-gekoppelten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers und einem chemilumineszenten HRP-Substrat detektiert. Die weiteren Antikörper wurden jeweils durch Fluorochrom-gekoppelte, Spezies-spezifische Detektionsantikörper mithilfe eines *infrared imaging systems* nachgewiesen.

Antikörper spezifisch für humanes IgG-Fc wurden der anti-PDL1-Fc Miniantikörper mit enthaltener IgG4 Fc-Domäne und die schwere Antikörperkette von Atezolizumab (IgG1) detektiert (Abbildung 4.4, B). Für die Immunoblot-Analyse mit einem IL-12 (p40/p70)-spezifischen Antikörper wurde das Kontrollprotein IL-12 unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, um die Heterodimerstruktur des Zytokins zu erhalten (Abbildung 4.4, C). Nach der Detektion wurden in der IL-12-Kontrolle tatsächlich zwei Proteinbanden entsprechend der molekularen Massen des IL-12 Heterodimers (70 kDa) und der Proteinuntereinheit p40 (40 kDa) detektiert. In den Eluatfraktionen des Immunzytokins anti-PDL1-sclL12 wurden auch nach Färbung mit dem IL-12-spezifischen Antikörper neben dem intakten Antikörperperfusionsprotein zwei weitere Proteinbanden mit geringerer molekularen Masse detektiert. Mit einem IL-15-spezifischen Antikörper wurden sowohl das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 als auch die IL-15-Superagonist enthaltenden Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 detektiert (Abbildung 4.4, D). Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 konnten zudem durch Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gerichtet gegen den IL-15-Rezeptor α in den Eluaten identifiziert werden (Abbildung 4.4, E).

In den verschiedenen durchgeführten Immunoblot-Analysen fiel jeweils auf, dass die Antikörperperfusionsproteine eine höhere molekulare Masse aufwiesen als durch die *Online* Bioinformatik-Plattform "ProtParam" (<https://web.expasy.org/protparam>) berechnet wurde (Tabelle 4.1.1). Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der molekularen Masse sind an die Proteine kovalent gebundene Glykosylgruppen, die als posttranslationale Modifikation im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat angehängt werden. Mit den *Online* Bioinformatik-Plattformen "NetNGlyc 1.0" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) und "NetOGlyc 4.0" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) können Aminosäuresequenzen auf potenzielle N- und O-Glykosylierungsstellen untersucht werden. Für die verschiedenen Antikörperperfusionsproteine wurden jeweils mindestens eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle und mehrere

Tabelle 4.1.2: Potenzielle N- und O-Glykosylierungsstellen der Antikörperperfusionsproteine. Mithilfe der Online Bioinformatik-Plattformen "NetNGlyc 1.0" und "NetOGlyc 4.0" wurden die Aminosäuresequenzen der Antikörperperfusionsproteine auf potenzielle N- und O-Glykosylierungsstellen untersucht.

| Antikörperperfusionsprotein | Potenzielle N-Glykosylierungsstellen | Potenzielle O-Glykosylierungsstellen |
|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| anti-PDL1-Fc (Monomer) | 1 | 6 |
| anti-PDL1-sclL12 | 4-6 | 19 |
| anti-PDL1-IL15 | 1-3 | 6 |
| anti-PDL1-RD-IL15 | 1-3 | 7 |
| RD-IL15-anti-PDL1 | 1-3 | 7 |

Ergebnisse

O-Glykosylierungsstellen identifiziert (Tabelle 4.1.2). Das Immunzytokin anti-PDL1-sclIL12 weist vergleichsweise viele potenzielle Glykosylierungsstellen auf, was die starke Abweichung zwischen berechneter und beobachteter molekularer Masse erklärt.

Um zu überprüfen, ob die Antikörperfusionsproteine tatsächlich kovalent gebundene Glykosylreste aufweisen, wurden die Fusionsproteine mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) verdaut. Die Amidase PNGase F ist in der Lage, den Großteil der in Eukaryoten vorkommenden N-Glykosylgruppen zu entfernen. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Antikörperfusionsproteine (40 pmol) jeweils im glykosylierten und im deglykosylierten Zustand in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Antikörperfusionsproteine wurden mit einem antiidiotypischen, Atezolizumab-spezifischen Antikörper und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für murines IgG detektiert (Abbildung 4.5). In der Immunoblot-Analyse ist erkennbar, dass die Antikörperfusionsproteine im unverdauten Zustand jeweils eine größere molekulare Masse aufweisen als nach dem enzymatischen Verdau mit PNGase F. Nach der Deglykosylierung stimmten die detektierten molekularen Massen der Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 mit den mithilfe der *Online* Bioinformatik-Plattform "ProtParam" berechneten Werten ungefähr überein. Nur das Immunzytokin anti-PDL1-sclIL12 wies auch nach dem Verdau mit PNGase F, vermutlich durch noch verbleibende O-Glykosylreste, eine erhöhte molekulare

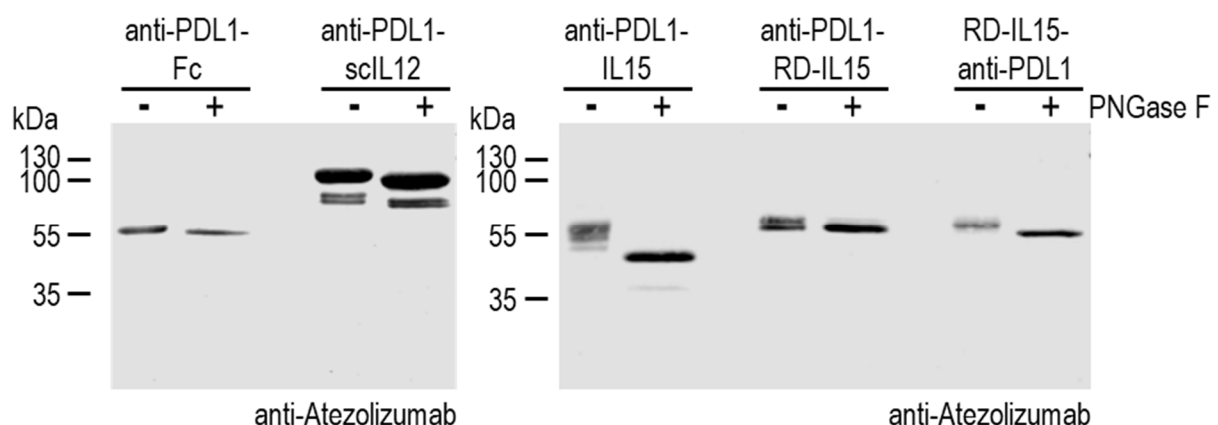


Abbildung 4.5: **Glykosylierung der isolierten Antikörperfusionsproteine.** Jeweils 40 pmol der Antikörperfusionsproteine wurden mit dem Enzym PNGase F für 30 min bei 37 °C verdaut, um in den Proteinen vorhandene N-Glykosylierungen zu entfernen. Anschließend wurden die Antikörperfusionsproteine in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte, glykosylierte Antikörperfusionsproteine auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Immunoblots wurden mit einem antiidiotypischen Antikörper spezifisch für Atezolizumab und einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für murines IgG gefärbt. Die Detektion erfolgte anschließend mithilfe eines *infrared imaging systems*.

Ergebnisse

Masse auf. Die Immunzytokine anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-RD-IL15, welche bei vorherigen Immunoblot-Analysen als Proteindoppelbände detektiert wurden, lagen nach dem Verdau mit PNGase F jeweils als einzelne Proteinbände vor. Diese Ergebnisse zeigen, dass die isolierten Antikörperfusionsproteine N-Glykosylierungen aufweisen und zum Teil auch mit verschiedenen Glykosylierungsmustern vorliegen.

Nach Bestätigung der Identität und Integrität der Antikörperfusionsproteine sowie dem Nachweis kovalent gebundener Glykosylreste auf den eluierten Proteinen, wurde die mögliche Bildung von Multimeren oder Aggregaten der Antikörperfusionsproteine untersucht. Hierfür wurden jeweils 22 pmol der Antikörperfusionsproteine unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend entweder durch Coomassie-Färbung (Abbildung 4.6, A) detektiert oder in Immunoblot-Analysen untersucht (Abbildung 4.6, B). Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde mithilfe eines HRP-gekoppelten anti-human IgG-Fc Antikörpers detektiert. Die Immunzytokine wurden in den Immunoblot-Analysen mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper und anschließender Färbung mit einem HRP-gekoppelten Antikörper spezifisch für murines IgG nachgewiesen. Unter reduzierenden Bedingungen wurde der anti-PDL1-Fc Miniantikörper als etwa 55 kDa große Proteinbände, entsprechend der Masse des Monomers detektiert (Spuren 1 und 11). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist der anti-PDL1-Fc Miniantikörper dazu in der Lage, Homodimere zu bilden, was durch die Detektion einer zweiten, höhermolekularen Proteinbände von ca. 130 kDa in den Immunoblot-Analysen belegt wurde (Spur 12). In den Eluatfraktionen der Immunzytokine anti-PDL1-scIL12 und anti-PDL1-IL15 wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen neben den als Monomer vorliegenden Fusionsproteinen ebenfalls weitere Proteinbänden mit höherer molekularer Masse detektiert. Neben dem anti-PDL1-scIL12 Monomer, welches als etwas 110 kDa große Proteinbände detektierbar war, wurde eine zweite Proteinbände mit einer molekularen Masse von mehr als 180 kDa detektiert (Spur 17). Diese zusätzliche Proteinbände weist entweder auf durch anti-PDL1-scIL12 gebildete Dimere oder Proteinaggregate hin. In der Eluatfraktion von anti-PDL1-IL15 wurden neben dem Monomer zwei weitere Proteinbänden mit einer molekularen Masse von 130 kDa und von mehr als 180 kDa nachgewiesen (Spur 18). Während die 130 kDa Proteinbände möglicherweise auf gebildete Dimere des Immunzytokins anti-PDL1-IL15 zurückzuführen ist, stellt die zweite höhermolekulare Proteinbände vermutlich Proteinaggregate dar. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 lagen sowohl unter reduzierenden Bedingungen (Spuren 4, 5, 15 und 16) als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Spuren 9, 10, 19 und 20) als reine Monomere vor. In den durchgeführten Analysen fiel zudem auf, dass das Immunzytokin anti-PDL1-RD-IL15 unter reduzierenden Bedingungen (Spuren 9 und 19) nach Auflösung der im Protein enthaltenen Disulfidbrücken, ein anderes Laufverhalten aufwies als unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Spuren 4 und 15).

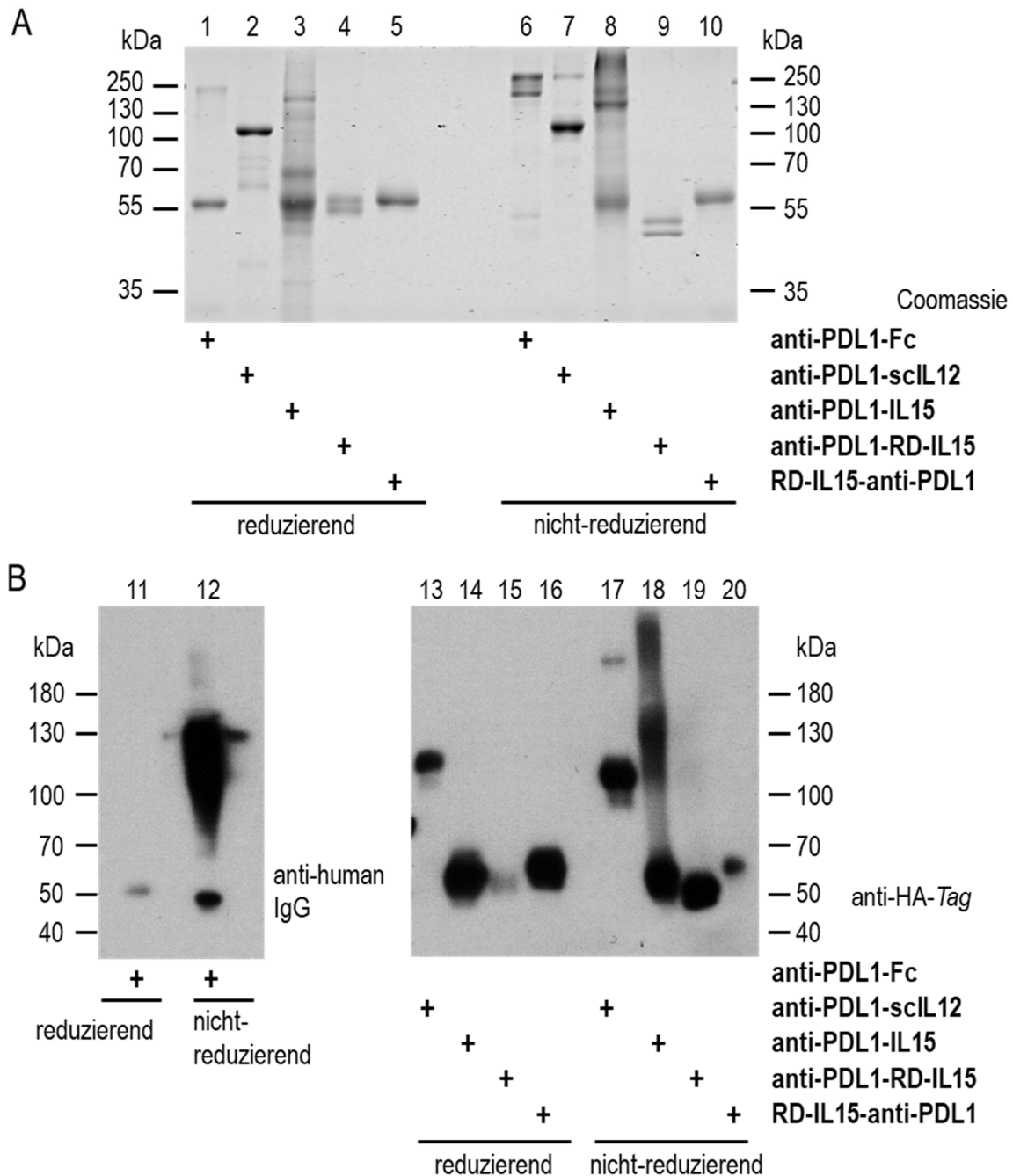


Abbildung 4.6: Analyse der Bildung von Multimeren der Antikörperperfusionsproteine. Jeweils 22 pmol der Antikörperperfusionsproteine wurden unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden zur Detektion anschließend mittels Coomassie gefärbt **(A)** oder in einem Immunoblot untersucht **(B)**. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde mithilfe eines HRP-gekoppelten Antikörpers spezifisch für humanes IgG nachgewiesen. Die Immunzytokine wurden mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für murines IgG gefärbt. Die Detektion erfolgte mithilfe eines chemilumineszenten HRP-Substrats.

4.1.3. Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2

Die vier PD-L1-spezifischen Immunzytokine (anti-PDL1-sclL12, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1) sowie der PD-L1-spezifische Miniantikörper (anti-PDL1-Fc) wurden erfolgreich in stabil transfizierten HEK293 Zellen produziert und anschließend aus den Zellkulturüberständen isoliert. Die Konzentration der eluierten Antikörperfusionsproteine variierte dabei zwischen 1,1 und 6,9 μM . In Immunoblot-Analysen wurde die Identität und Integrität der eluierten Antikörperfusionsproteine durch die Detektion der verschiedenen Antikörper- und Zytokindomänen bestätigt. Durch den Verdau mit dem Enzym PNGase F wurde zudem eine Glykosylierung der Antikörperfusionsproteine nachgewiesen. In weiteren Analysen konnte die Bildung von Homodimeren durch den anti-PDL1-Fc Miniantikörper nachgewiesen werden. Die Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-IL15 wiesen in den Immunoblot-Analysen trotz modifizierter *hinge*-Region zum Teil auch Proteinbanden mit höherer molekularer Masse auf, welche möglicherweise auf gebildete Dimere oder Proteinaggregate zurückzuführen sind. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 lagen hingegen als reine Monomere vor. Funktionelle Charakterisierung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine

4.1.4. Bindung an PD-L1 über die PD-L1-spezifische Antikörperdomäne

Nach der biochemischen Charakterisierung wurden die isolierten Antikörperfusionsproteine in weiteren Assays auf ihre Funktionalität hin analysiert. In einem Immunpräzipitationsexperiment wurde zunächst untersucht, ob die Antikörperfusionsproteine das Antigen PD-L1 binden können (Abbildung 4.7). Hierfür wurden Protein-G-gekoppelte, magnetische Dynabeads mit 5 μg des isolierten Miniantikörpers anti-PDL1-Fc beladen und anschließend mit Lysat der PD-L1-positiven, epidermoiden Karzinomzelllinie A431 inkubiert. Die PD-L1-Expression der A431 Zellen wurde im Vorfeld durchflusszytometrisch bestätigt (Abbildung 4.7, B). Proteine, die durch den anti-PDL1-Fc Miniantikörper gebundenen wurden, wurden magnetisch mithilfe der Dynabeads aus dem Ansatz isoliert, eluiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 4.7, A). In der nachfolgenden Immunoblot-Analyse mit einem PD-L1-spezifischen Antikörper konnten sowohl im unbehandelten Lysat der A431 Zellen als auch im Eluat der Immunpräzipitation Proteinbanden detektiert werden, welche der molekularen Masse von PD-L1 (40 kDa - 55 kDa) entsprechen (Abbildung 4.7, C). Dieses Ergebnis zeigt, dass der anti-PDL1-Fc Miniantikörper in der Tat PD-L1 spezifisch bindet.

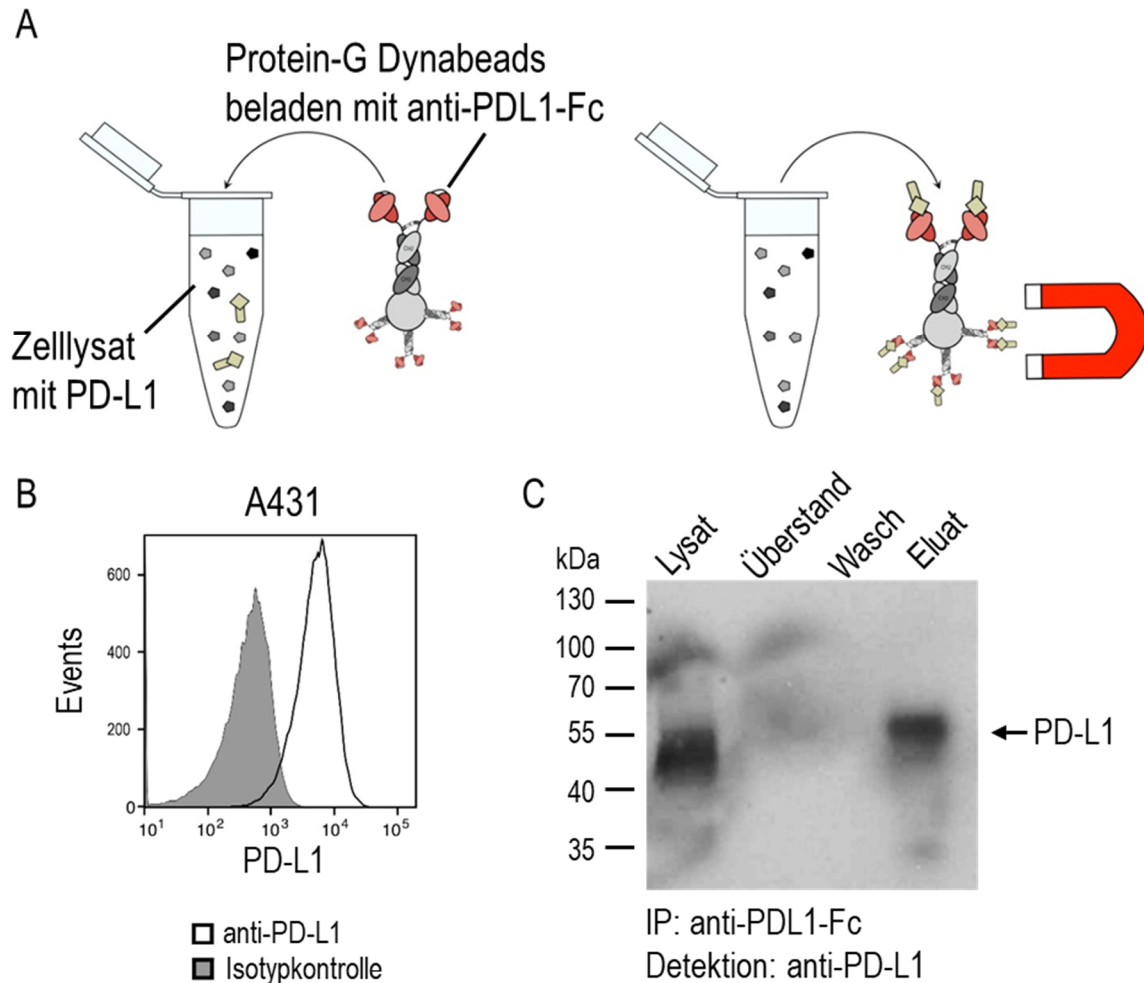


Abbildung 4.7: **Nachweis der Bindung von anti-PDL1-Fc an PD-L1 durch Immunpräzipitation. (A) Schematischer Ablauf der Immunpräzipitation.** Protein-G-gekoppelte, magnetische Dynabeads wurden mit 5 µg anti-PDL1-Fc Antikörper beladen. Die mit dem Miniantikörper beladenen Beads wurden mit Lysat von PD-L1-positiven A431 Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels eines Magneten zusammen mit den Beads isoliert und mit reduzierendem Lämmli-Puffer eluiert. **(B) Durchflusszytometrischer Nachweis der PD-L1-Expression der epidermoiden Karzinomzelllinie A431.** 10^6 A431 Zellen wurden mit einem APC-gekoppelten PD-L1-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten A431 Zellen, welche mit einem irrelevanten APC-gekoppelten Antikörper des gleichen Isotyps gefärbt wurden. **(C) Analyse der durchgeführten Immunpräzipitation mittels Immunoblot.** Die eluierten Proteine der Immunpräzipitation wurden zusammen mit den Kontrollen (Lysat, Überstand und Wasch-Fraktion) in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Immunoblot wurde mit einem PD-L1-spezifischen Antikörper und einem HRP-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper gefärbt. Die Detektion erfolgte mit einem chemilumineszenten HRP-Substrat.

Da die Immunzytokine aufgrund der fehlenden Fc-Domäne nicht auf Protein-G-gekoppelte Dynabeads geladen werden können, wurde die Bindung der in den Immunzytokinen enthaltenen Antikörperdomänen an PD-L1 in einem Sandwich-ELISA untersucht. Als *Capture*-Protein für den Sandwich-ELISA wurde rekombinantes PD-L1-Fc Protein eingesetzt, welches über Nacht auf einer ELISA-Platte immobilisiert wurde. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurden die generierten Antikörperperfusionsproteine in verschiedenen Konzentrationen zu dem immobilisierten PD-L1-Fc Protein gegeben und für 1 h inkubiert. Gebundene Antikörperperfusionsproteine wurden

anschließend mit einem Biotin-gekoppelten, antiidiotypischen Antikörper spezifisch für Atezolizumab, gefolgt von HRP-gekoppeltem Streptavidin und TMB-Substratlösung nachgewiesen. Das durch die Peroxidase enzymatisch umgesetzte TMB-Substrat kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm detektiert werden. (Abbildung 4.8, A).

Als Positivkontrolle diente der PD-L1-spezifische Antikörper Atezolizumab, welcher ebenfalls durch

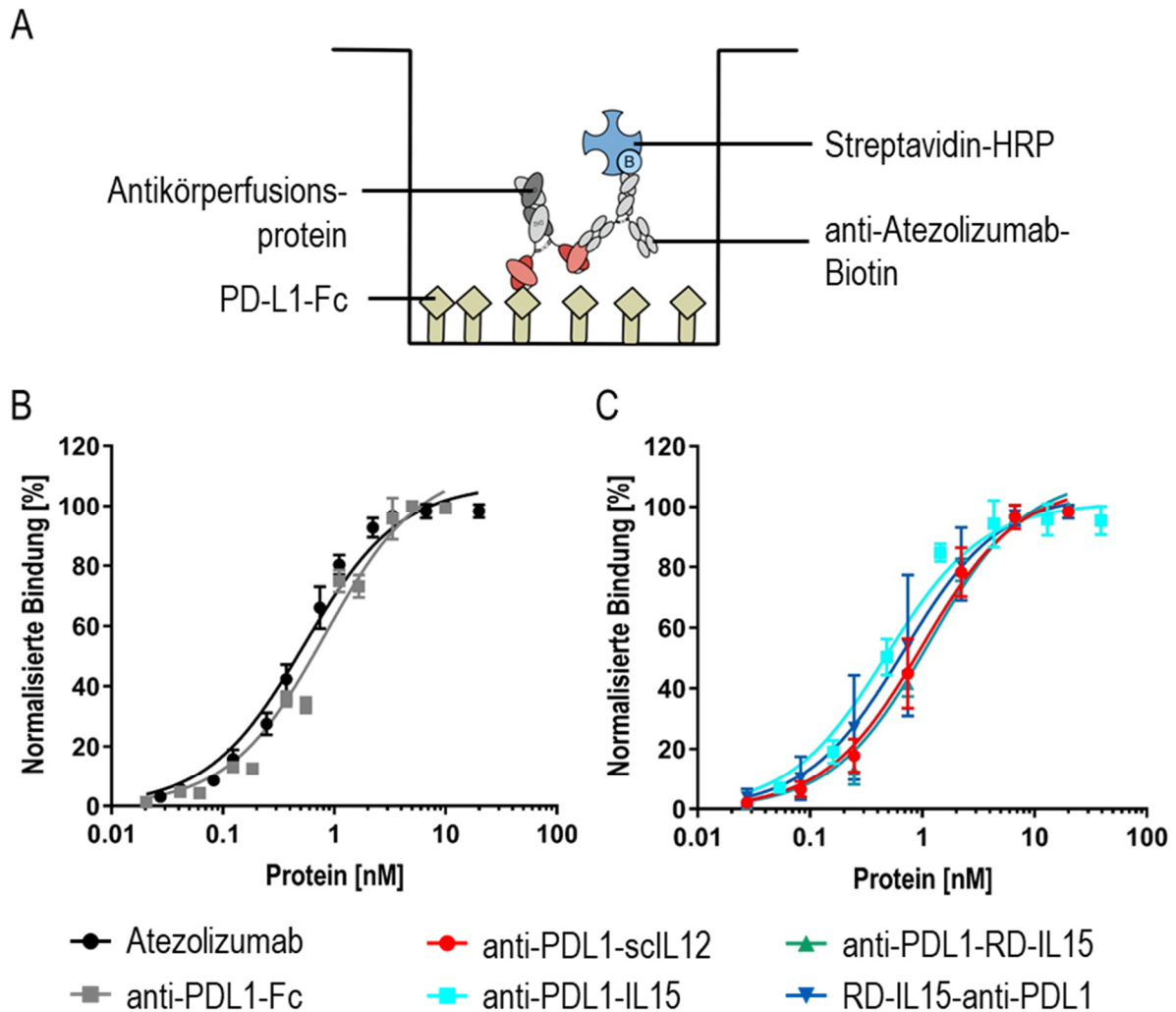


Abbildung 4.8: Nachweis der Bindung der Antikörperperfusionsproteine an PD-L1 mittels ELISA. (A) Schematische Darstellung des durchgeführten Sandwich-ELISA. 100 ng rekombinantes PD-L1-Fc Protein wurden über Nacht in 100 µl PBS pro Vertiefung auf eine 96-Well-ELISA-Platte immobilisiert. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungsstellen abgeblockt, anschließend die Antikörperperfusionsproteine in ansteigenden Konzentrationen zu den Vertiefungen gegeben und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl PBS-T wurden die an PD-L1-Fc gebundenen Antikörperperfusionsproteine mit einem Biotin-gekoppelten, nicht-blockierenden Antikörper spezifisch gegen Atezolizumab und mit Streptavidin-HRP gefärbt. Gebundene Antikörper wurden nach Inkubation mit TMB-Substratlösung photometrisch detektiert. Für die Negativkontrolle wurden mit PD-L1-Fc beschichtete Vertiefungen verwendet, welche nicht mit Antikörperperfusionsproteinen inkubiert wurden. Als Positivkontrolle diente ein von Atezolizumab abgeleiteter PD-L1-spezifischer Antikörper. Konzentrationsabhängige Bindung von anti-PDL1-Fc Miniantikörper (**B**) und Immunitokinen (**C**) an PD-L1-Fc. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

den antiidiotypischen Detektionsantikörper gebunden wird. Für alle Antikörperperfusionsproteine, wie auch den Kontroll-Antikörper, konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an rekombinantes PD-L1-Fc nachgewiesen werden. In unbeschichteten Kontroll-Vertiefungen wurden hingegen keine gebundenen Antikörperperfusionsproteine detektiert. Mithilfe der Software GraphPad Prism 7.02 wurden die in den Standardreihen photometrisch ermittelten OD-Werte normalisiert und anschließend mittels linearer Regression die Sättigungskurven für die Bindung an PD-L1 bestimmt. Aus den erstellten Sättigungskurven wurden näherungsweise die Dissoziationskonstanten (K_d) für die Bindung der Antikörperperfusionsproteine an PD-L1-Fc berechnet. Die Dissoziationskonstante beschreibt die Proteinkonzentration, welche die Antigenbindungsstellen halbmaximal absättigt, und kann als Maß für die Bindungsaffinität oder –avidität eines Proteins herangezogen werden. Der vom Hersteller beschriebene K_d -Wert von 0,4 nM für den Atezolizumab Kontrollantikörper konnte mit dem durchgeführten Sandwich-ELISA annähernd reproduziert werden ($0,53 \pm 0,04$ nM) (Abbildung 4.8 B, Tabelle 4.1.3). Obwohl der anti-PDL1-Fc Miniantikörper, ähnlich wie der Kontrollantikörper, zwei Antigenbindestellen besitzt und somit in der Lage ist bivalent an PD-L1 zu binden, wurde für den Miniantikörper eine geringere Bindungsaffinität ermittelt ($K_d = 0,82 \pm 0,07$ nM). Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 wies mit einem K_d -Wert von 0,68 nM eine im Vergleich zu den anderen Immunzytokinen stärkere Bindung an PD-L1-Fc Protein auf. Die Immunzytokine anti-PDL1-scIL12 (1,51 nM), anti-PDL1-RD-IL15 (1,75 nM) und RD-IL15-anti-PDL1 (1,2 nM) zeigten jeweils eine schwächere Bindung an rekombinantes PD-L1-Fc Protein, wobei sich die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 trotz der gleichen enthaltenen Antikörper- und Zytokindomänen in ihrer

Tabelle 4.1.3: Mittels Sandwich-ELISA näherungsweise ermittelte K_d -Werte der Antikörperperfusionsproteine. Mithilfe eines Sandwich-ELISA wurde die Bindung der gereinigten Antikörperperfusionsproteine an PD-L1-Fc nachgewiesen. Mithilfe der Software GraphPad Prism 7.02 wurden die Dissoziationskonstanten der Antigenbindung näherungsweise berechnet. Die Dissoziationskonstante (K_d) wird definiert als Konzentration der halbmaximalen Sättigung der Proteinbindung. Für den Kontroll-Antikörper Atezolizumab und anti-PDL1-Fc beziehen sich die molaren Konzentrationen jeweils auf das Dimer. Bei den Immunzytokinen wurde jeweils von als Monomer vorliegenden Fusionsproteinen ausgegangen.

| Antikörperperfusionsprotein | Apparente Dissoziationskonstante K_d [nM] |
|----------------------------------|---|
| anti-PD-L1 (Kontroll-Antikörper) | $0,53 \pm 0,04$ |
| anti-PDL1-Fc | $0,82 \pm 0,07$ |
| anti-PDL1-scIL12 | $1,51 \pm 0,23$ |
| anti-PDL1-IL15 | $0,68 \pm 0,13$ |
| anti-PDL1-RD-IL15 | $1,75 \pm 0,54$ |
| RD-IL15-anti-PDL1 | $1,2 \pm 0,3$ |

Ergebnisse

Bindung an PD-L1-Fc unterschieden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die beobachteten Unterschiede in der Stärke der Bindung an PD-L1-Fc Protein zwischen den unterschiedlichen Antikörperfusionsproteinen nicht als erheblich einzustufen waren (maximal 2- bis 6-fach).

Nach dem Nachweis der spezifischen Bindung der verschiedenen Antikörperfusionsproteine an humanes PD-L1 und rekombinantes PD-L1-Fc mittels Immunpräzipitation und Sandwich-ELISA wurde in durchflusszytometrischen Analysen die Bindung der Antikörperfusionsproteine an PD-L1-exprimierende Zellen untersucht. Hierfür wurden jeweils 10^6 PD-L1-positive A431 und PD-L1-negative K562 Zellen mit 10 pmol der Antikörperfusionsproteine in 50 μ l FACS-Puffer inkubiert (Abbildung 4.9). Auf den Zellen gebundene Antikörperfusionsproteine wurden mit einem APC-gekoppelten His₆-Tag-spezifischen Antikörper oder im Fall des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers mit einem APC-gekoppelten Antikörper gerichtet gegen humanes IgG-Fc gefärbt. Als Kontrolle wurden 10^6 A431 und K562 Zellen mit einem APC-gekoppelten, PD-L1-spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, dass die generierten Antikörperfusionsproteine und der anti-PD-L1 Kontrollantikörper die PD-L1-positive Zelllinie A431, aber nicht die PD-L1-negative Zelllinie K562 binden. Diese Ergebnisse weisen nach, dass die Antikörperfusionsproteine auch an PD-L1 binden können, wenn der Ligand auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird.

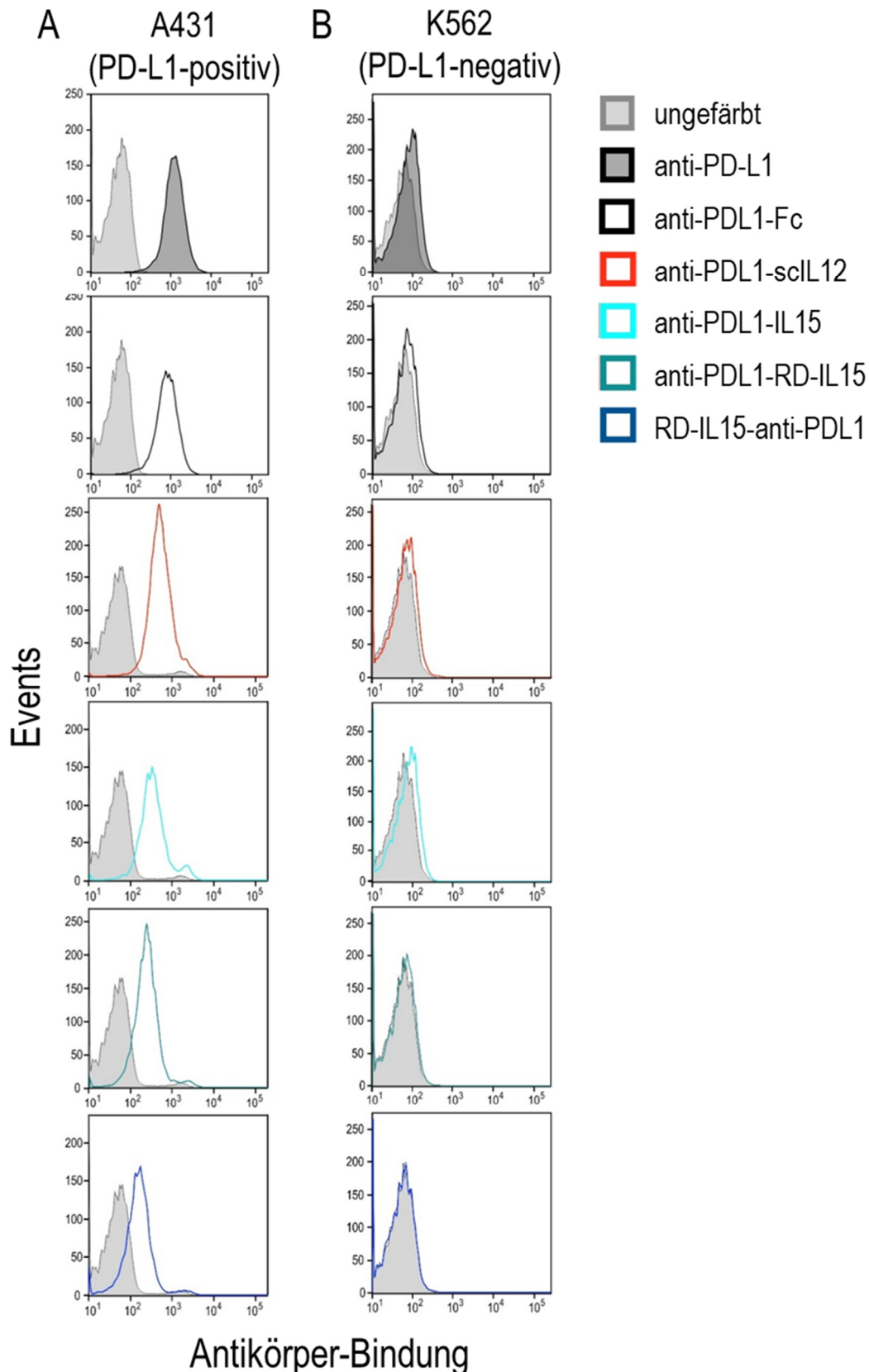


Abbildung 4.9: **Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der Antikörperperforationsproteine an PD-L1-positive Tumorzellen.** Jeweils 10^6 PD-L1-exprimierende A431 (**A**) und PD-L1-negative K562 (**B**) Zellen wurden in 50 μ l FACS-Puffer mit 10 pmol Antikörperperforationsproteinen inkubiert. Gebundene Antikörperperforationsproteine wurden durch Färbung mit APC-gekoppelten anti-His₆-Tag-spezifischen Antikörper oder im Fall von anti-PDL1-Fc mit anti-human IgG Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienten A431 und K562 Zellen, welche mit einem APC-gekoppelten PD-L1-spezifischen Kontrollantikörper gefärbt wurden.

4.1.5. Funktionalität der Zytokindomänen der PD-L1-spezifischen Immunzytokine

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Funktionalität der in den Antikörperfusionsproteinen enthaltenen Zytokindomänen untersucht.

IL-12 induziert durch die Bindung an den IL-12-Rezeptorkomplex, bestehend aus IL12R β 1 und IL12R β 2, die Rekrutierung und anschließende Aktivierung der beiden Janus-Kinasen JAK2 und Tyk2. Die aktivierten Kinasen sind anschließend dazu in der Lage, den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 4* (STAT4) zu phosphorylieren (Abbildung 4.10, A). In Immunoblot-Analysen kann über die Detektion von phosphoryliertem STAT4 (pSTAT4) somit die Bindung des IL-12-Rezeptorkomplexes und die anschließende Aktivierung des IL-12-Signalwegs nachgewiesen werden. Um die Aktivität der in dem Antikörperfusionsprotein anti-PDL1-sclIL12 enthaltenen Zytokindomäne zu untersuchen, wurden jeweils 3×10^6 NK-92/5.28.z Zellen für 30 min mit 5 ng/ml murinem IL-12 oder äquimolaren Konzentrationen an anti-PDL1-Fc und anti-PDL1-sclIL12 (0,067 nM) stimuliert. Anschließend wurden die Proteinlysate der NK-92/5.28.z Zellen in einem Immunoblot mit Antikörpern

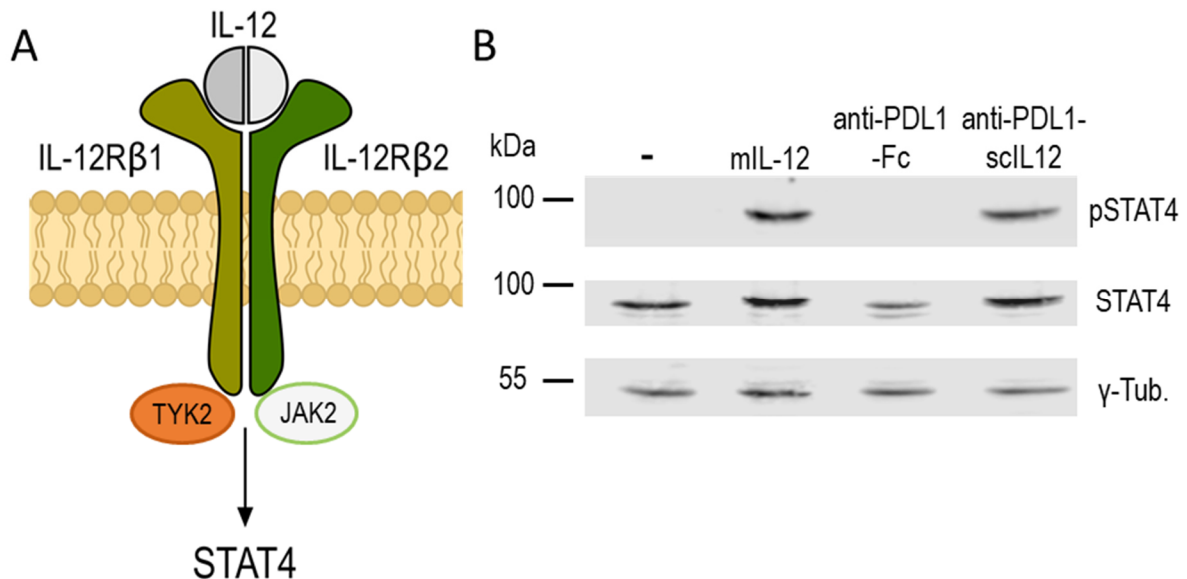


Abbildung 4.10: **Stimulation des IL-12-Rezeptorkomplexes durch anti-PDL1-sclIL12. (A) Aufbau des IL-12-Rezeptorkomplexes und Aktivierung von STAT4.** Die Aktivierung des IL-12 Rezeptorkomplexes führt zur Aktivierung der Kinasen JAK2 und Tyk2 und zur anschließenden Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4. **(B) Phosphorylierung von STAT4 nach Stimulation mit anti-PDL1-sclIL12.** 3×10^6 NK-92/5.28.z Zellen wurden für 30 min mit 5 ng/ml murinem IL-12 (mIL-12) oder äquimolaren Konzentrationen an anti-PDL1-Fc und anti-PDL1-sclIL12 (0,067 nM) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteinlysate in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern spezifisch für STAT4 beziehungsweise phosphoryliertes STAT4 (pSTAT4) untersucht. Als Ladekontrolle diente ein γ -Tubulin-spezifischer Antikörper. Für die Detektion wurden jeweils Spezies-spezifische, Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, welche mithilfe eines *infrared imaging systems* nachgewiesen wurden.

spezifisch für STAT4, pSTAT4 (pY693) und γ -Tubulin analysiert (Abbildung 4.10, B). Wie erwartet konnte in den Lysaten unstimulierter NK-92/5.28.z Zellen kein pSTAT4 nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit murinem IL-12 oder rekombinantem anti-PDL1-sclL12 wurde eine pSTAT4-spezifische Proteinbande in den Proteinlysaten detektiert. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper hatte dagegen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors. Diese Ergebnisse zeigen, dass die sclL-12-Domäne des Immunzytokins anti-PDL1-sclL12 funktionell aktiv ist und durch die Aktivierung des IL-12-Rezeptorkomplexes die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4 induziert.

IL-15 und IL-2 sind Zytokine der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten-Familie, welche durch Bindung an ihren dazugehörigen Rezeptorkomplex jeweils die Rekrutierung und Aktivierung der Janus-Kinasen JAK1 und JAK3 induzieren. Die aktivierten Kinasen JAK1 und JAK3 phosphorylieren anschließend den Transkriptionsfaktor STAT5 (Abbildung 4.11, A). In Immunoblot-Analysen kann über die Detektion von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) somit die Bindung des IL-15/IL-2-Rezeptorkomplexes und die anschließende Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs nachgewiesen werden.

Für den Funktionalitätsnachweis der in den Fusionsproteinen enthaltenen IL-15-/IL-15-Superagonist-Domänen wurden jeweils 3×10^6 NK-92/5.28.z Zellen für 24 h ohne IL-2 kultiviert, bevor sie anschließend für 30 min mit 5 ng/ml rekombinantem IL-15 oder äquimolaren Konzentrationen (0,39 nM) an anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten NK-92/5.28.z Zellen, welche auch über Nacht in Standard-Zellkulturmedium X-VIVO⁺⁺ (mit 100 IU/ml IL-2) kultiviert wurden. In den nachfolgenden Immunoblot-Analysen wurden die Proteinlysate der NK-92/5.28.z Zellen mit Antikörpern spezifisch für STAT5, pSTAT5 (pY694) und γ -Tubulin analysiert. In den Lysaten der mit IL-2 kultivierten NK-92/5.28.z Zellen (Spur 1) wurde erwartungsgemäß eine pSTAT5-spezifische Proteinbande detektiert. Durch den Entzug von IL-2 über 24 h wurde die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors fast komplett abgebaut (Spur 2). Die Stimulation mit IL-15 oder den rekombinanten Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 rekonstituierte die Phosphorylierung von STAT5 (Spuren 3, 5, 6, 7). Der Miniantikörper anti-PDL1-Fc beeinflusste die Phosphorylierung von STAT5 dagegen nicht (Spur 4). Diese Ergebnisse belegen, dass die Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 abhängig von ihren enthaltenen IL-15/IL-15-Superagonist-Domänen dazu in der Lage sind, in NK-92/5.28.z Zellen die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor STAT5 zu induzieren. Dies zeigt, dass die Zytokindomänen in den Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 funktionell aktiv sind.

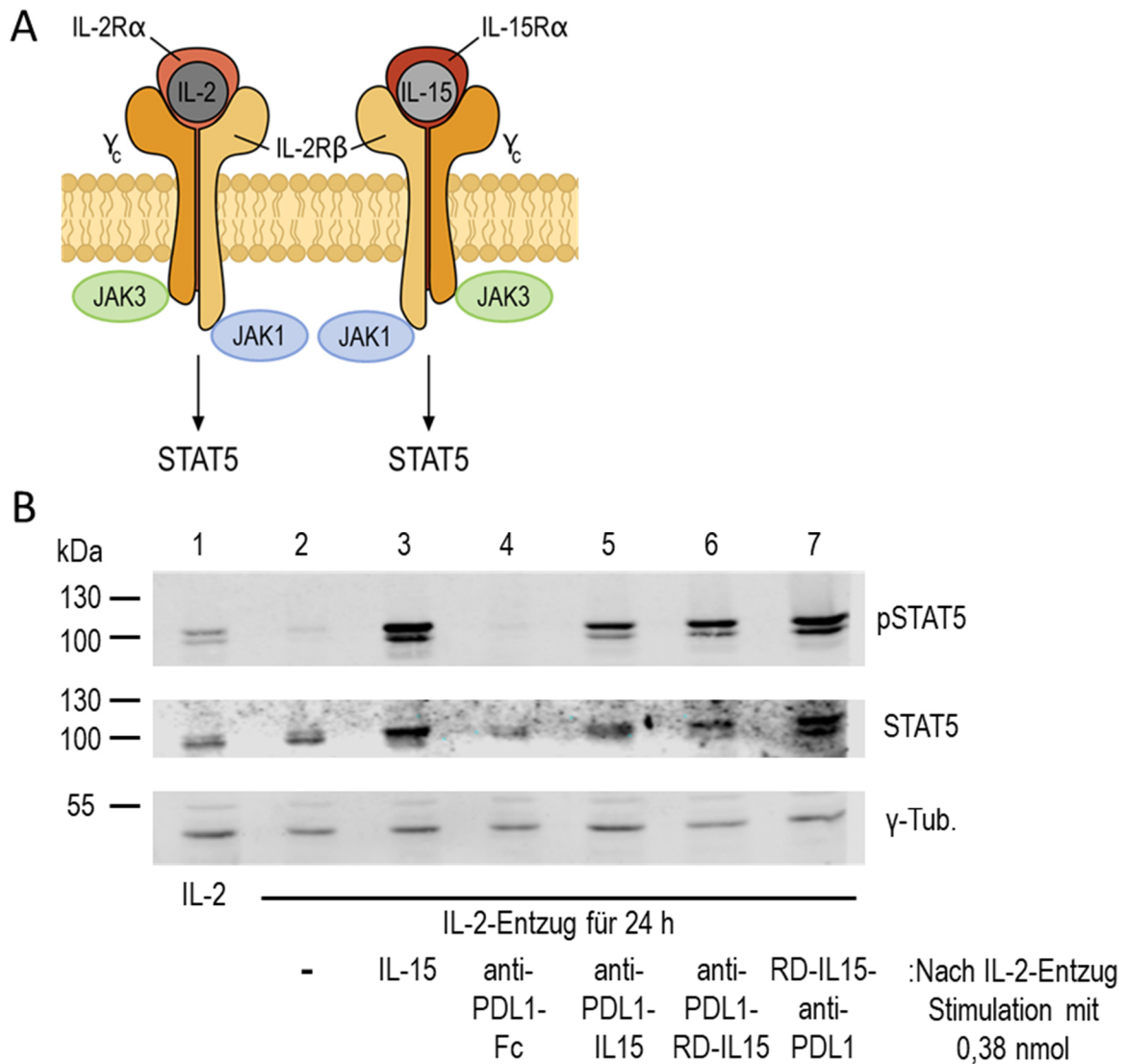


Abbildung 4.11: **Stimulation des IL-15-Rezeptorkomplexes durch anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1.** (A) **Aufbau des IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexes und Aktivierung von STAT5.** Die Aktivierung des IL-15- beziehungsweise IL-2-Rezeptorkomplexes löst die Aktivierung der Janus-Kinasen JAK3 und JAK1 und die anschließende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5 aus. **Funktionalität der IL-15/IL-15-Superagonist-Domänen in den Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1.** NK-92/5.28.z Zellen wurden über Nacht in Medium ohne IL-2 kultiviert (X-VIVO⁺). Am nächsten Tag wurden jeweils 3×10^6 Zellen für 30 min mit 5 ng/ml rekombinantem IL-15 oder äquimolaren Konzentrationen (0,39 nM) an anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 stimuliert. Als Kontrolle dienten NK-92/5.28.z Zellen, welche nach IL-2 Entzug nicht stimuliert wurden oder über Nacht in Kompletmedium mit 100 IU/ml IL-2 (X-VIVO⁺⁺) kultiviert wurden. In Immunoblot-Analysen wurden die Lysate der NK-92/5.28.z Zellen mit Antikörpern spezifisch für STAT5 beziehungsweise phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) untersucht. Als Ladekontrolle diente ein γ -Tubulin-spezifischer Antikörper. Für die Detektion wurden jeweils Spezies-spezifische, Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, welche mithilfe eines *infrared imaging systems* nachgewiesen wurden.

4.1.6. Immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf primäre Immunzellen

Nach dem Nachweis der Funktionalität der Antikörper- und der Zytokindomänen der verschiedenen Fusionsproteine, wurde ihre immunstimulatorische Wirkung auf primäre Immunzellen untersucht. Hierfür wurde im Vorfeld zunächst die PD-1- und PD-L1-Expression auf primären Immunzellen durchflusszytometrisch analysiert. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs von gesunden Spendern isoliert. Jeweils 10^6 Zellen/ml wurden für 48 h in X-VIVO⁺⁺ \pm 0,5 μ g/ml Phytohämagglutinin-L (PHA-L) kultiviert. PHA-L ist ein Lektin der roten Kidneybohne (*Phaseolus vulgaris*). Es kann Lymphozyten durch die unspezifische Bindung von Glykoproteinen auf deren Zelloberfläche aktivieren und dadurch ähnlich wie eine andauernde Immunreaktion die Expression von immunregulatorischen Proteinen wie PD-1 und PD-L1 induzieren (Movafagh et al., 2011). Nach 48 h wurden die PBMCs geerntet und mit einem V500-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD3, einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD56 und einem PE-gekoppelten Antikörper spezifisch für PD-L1 oder PD-1 gefärbt. Hierdurch war es im Durchflusszytometer möglich CD3⁺CD56⁻ T-Zellen, CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen, CD3⁺CD56⁺ NKT-Zellen und die CD3⁻CD56⁻ Immunzellpopulationen zu unterscheiden und separat deren PD-1- und PD-L1-Expression zu analysieren (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13).

Die Expression von PD-L1 konnte bei den drei untersuchten Spendern jeweils auf allen Immunzellpopulationen bereits im unstimulierten Zustand (Abbildung 4.12, schwarze Linie) nachgewiesen werden. Die Stärke des PD-L1-Signals variierte dabei zwischen den verschiedenen Spendern, so wiesen Zellen von Donor 1 eine deutlich höhere PD-L1-Expression auf als Zellen der Spender 2 und 3. Innerhalb der Spender unterschieden sich die verschiedenen Immunzellpopulationen jedoch kaum in der Stärke des PD-L1-Signals. Durch die Stimulation mit PHA-L (rote Linie) wurde die PD-L1-Expression unabhängig vom Donor auf allen Immunzellpopulationen gesteigert.

Der *Immune Checkpoint*-Rezeptor PD-1 wurde im Gegensatz zu PD-L1 nicht homogen auf allen Immunzellpopulationen gleich stark exprimiert, sondern konnte im unstimulierten Zustand hauptsächlich auf den CD3-positiven T- und NKT-Zellen detektiert werden (Abbildung 4.13). Während die CD3-negativen Immunzellen von Donor 1 im unstimulierten Zustand eine geringe Expression von PD-1 aufwiesen, waren die CD3-negativen Zellen der anderen Spender PD-1-negativ. Durch die Stimulation mit PHA-L wurde die PD-1-Expression donorunabhängig auf den T- und NKT-Zellen erhöht und auch auf den CD3-negativen Immunzellpopulationen leicht induziert.

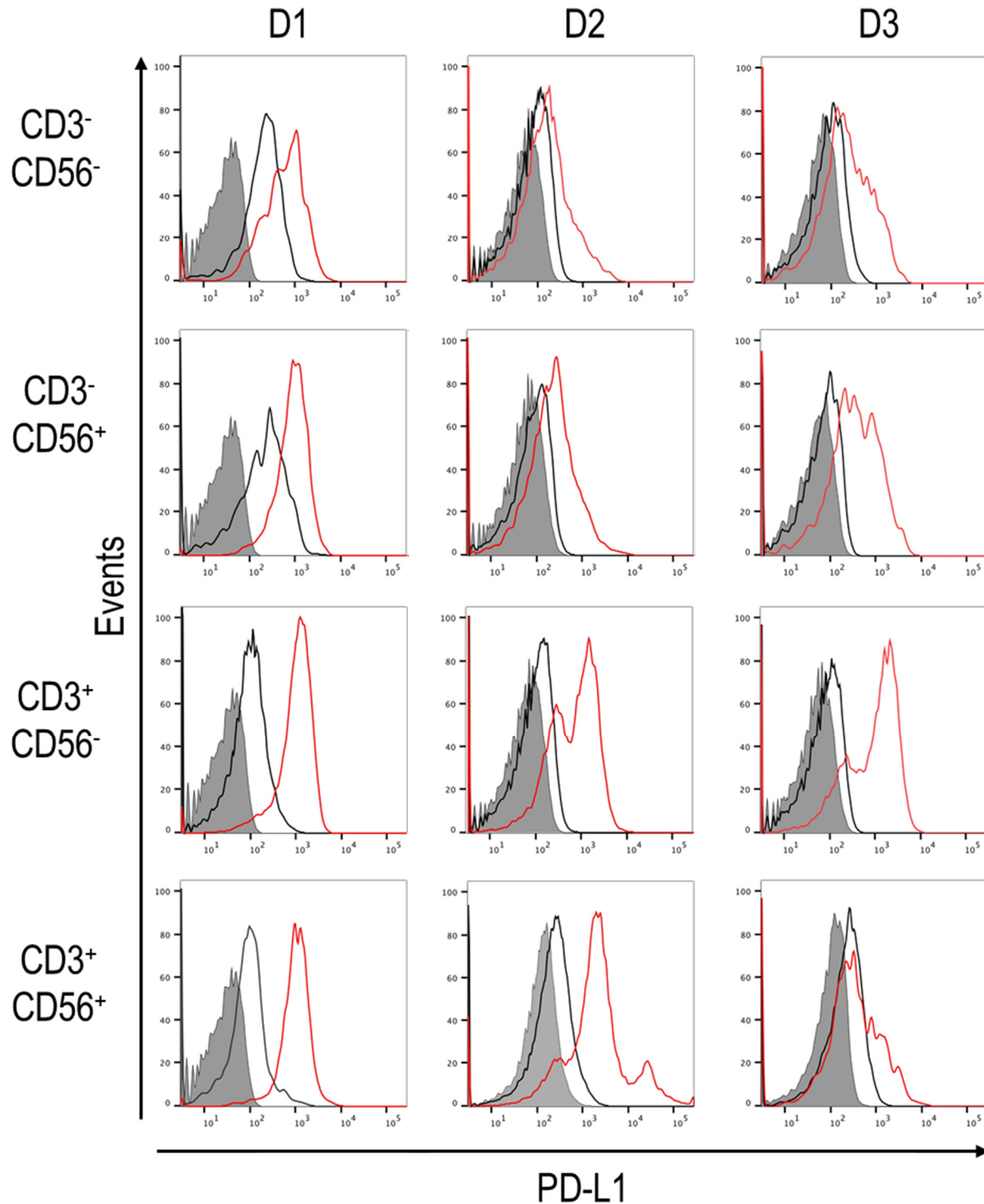


Abbildung 4.12: **PD-L1-Expression auf primären Immunzellen gesunder Spender.** Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden aus den Buffy-Coats gesunder Spender (D1, D2, D3) PBMCs isoliert. Die primären Immunzellen wurden für 48 h in X-VIVO⁺⁺ (10^6 Zellen/ml) \pm 0,5 μ g/ml PHA-L kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einem V500-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD3, einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD56 und einem PE-gekoppelten Antikörper spezifisch für PD-L1 gefärbt. Im Durchflusszytometer wurden die verschiedenen Immunzellpopulation auf die Expression von PD-L1 analysiert. Grau gefüllt: Isotyp-Kontrolle; schwarze Linie: X-VIVO⁺⁺; rote Linie: 0,5 μ g/ml PHA-L.

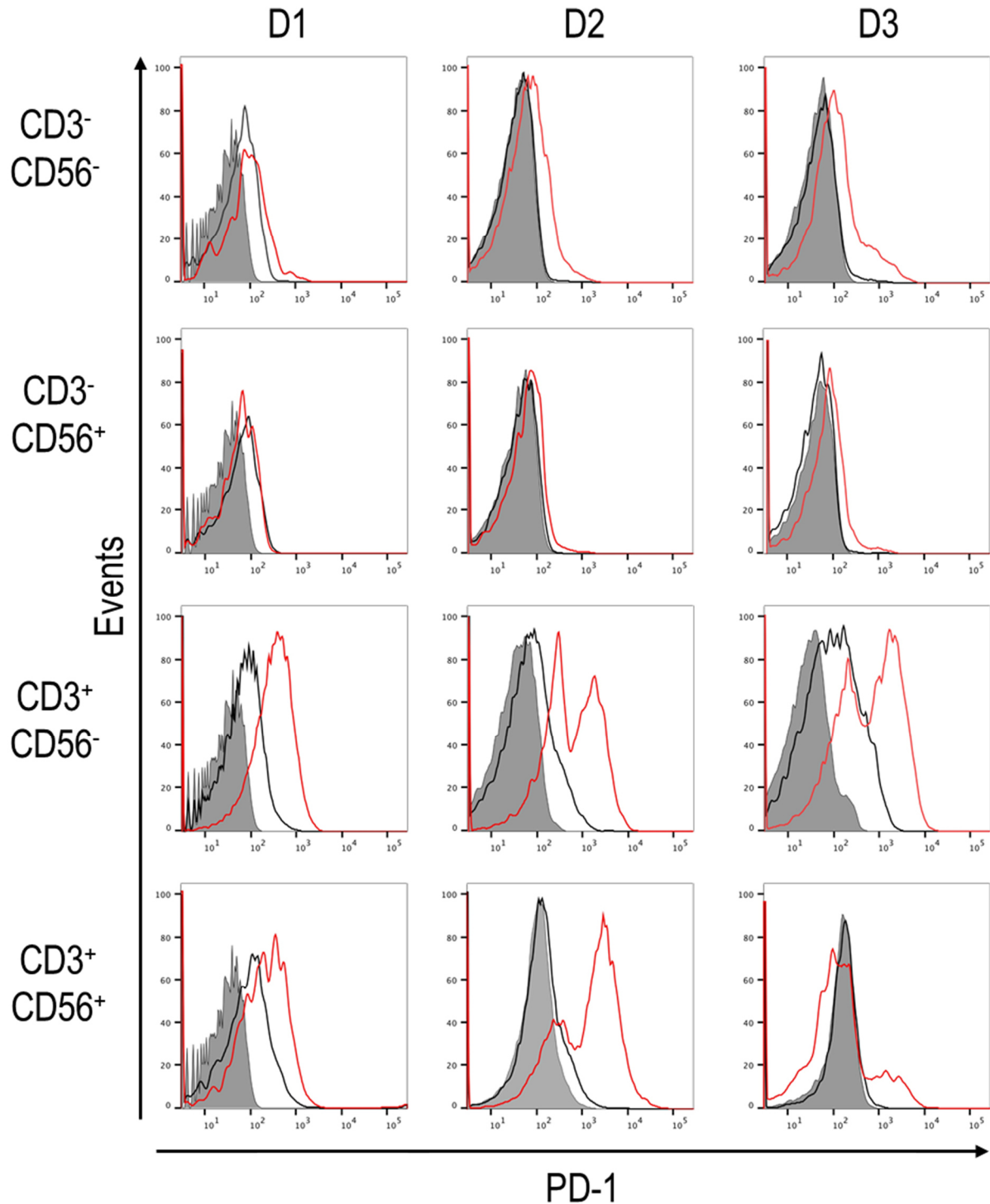


Abbildung 4.13: **PD-1-Expression auf primären Immunzellen gesunder Spender.** Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden aus den Buffy-Coats gesunder Spender (D1, D2, D3) PBMCs isoliert. Die primären Immunzellen wurden für 48 h in X-VIVO⁺⁺ (10⁶ Zellen/ml) \pm 0,5 µg/ml PHA-L kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einem V500-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD3, einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD56 und einem PE-gekoppelten Antikörper spezifisch für PD-1 gefärbt. Im Durchflusszytometer wurden die verschiedenen Immunzellpopulationen auf die Expression von PD-1 analysiert. Grau gefüllt: Isotyp-Kontrolle; schwarze Linie: X-VIVO⁺⁺; rote Linie: 0,5 µg/ml PHA-L.

Nach dem Nachweis der Expression des *Immune Checkpoint*-Rezeptors PD-1 und dessen Liganden PD-L1 auf den Immunzellen des peripheren Bluts wurde die immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine in einem Zytotoxizitätsassay mit PD-L1-negativen K562 Tumorzellen (siehe Abbildung 4.9) untersucht. Die Erythroleukämie-Zelllinie K562 exprimiert auf ihrer Zelloberfläche keine MHC Klasse-I-Moleküle, weshalb sie von primären NK-Zellen und auch NK-Zelllinien lysiert wird (Gong et al., 1994; Lozzio und Lozzio, 1975).

Für den Zytotoxizitätsassay wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und über Nacht mit 10 ng/ml (0,13 nM) murinem IL-12, 10 ng/ml (0,78 nM) humanem IL-15 oder den äquimolaren Konzentrationen an Immunzytokinen stimuliert. Am nächsten Tag wurden die PBMCs geerntet, gewaschen und anschließend in verschiedenen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen (engl. *effector to target cell ratio*, *E:T-Ratio*) mit Calcein Violet (CV)-gefärbten K562 Tumorzellen für 2 h kokultiviert. Lysierte K562 Zellen wurden anschließend nach Färbung mit Propidium-Iodid (PI) im Durchflusszytometer als CV/PI doppelt positive Zellen detektiert (Abbildung 4.14, A). Als Kontrolle für die spontane Lyse dienten K562 Zellen, welche ohne Effektorzellen mitgeführt wurden.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass die primären Immunzellen bereits im unstimulierten Zustand eine geringe Zytotoxizität gegenüber der Tumorzelllinie K562 aufwiesen. Bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 waren durchschnittlich 12,8 % \pm 1,0 % der analysierten K562 Zellen PI-gefärbt (Abbildung 4.14, B). Durch die Vorstimulation mit den Zytokin-Kontrollen IL-12 und IL-15 konnte die Zytotoxizität der primären Immunzellen gegenüber den K562 Tumorzellen jedoch signifikant gesteigert werden. Primäre Immunzellen, welche mit 0,13 nM murinem IL-12 vorstimuliert wurden, lysierten bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 durchschnittlich 40,4 % \pm 1,8 % der K562 Zellen und wiesen auch bei den niedrigeren Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen im Vergleich zu den Kontrollansätzen eine 3- bis 5-fach gesteigerte Zytotoxizität auf. Durch die Stimulation mit rekombinantem IL-15 wurde die spezifische Lyse der K562 Zellen sogar um das 5- bis 10-fache erhöht, so dass bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 im Durchschnitt 68,9 % \pm 1,1 % der analysierten K562 Zellen PI-gefärbt waren. Während der PD-L1-spezifische Miniantikörper und das rekombinante IgG4-Fc Kontrollprotein jeweils keinen Einfluss auf die Lyse der K562 Tumorzellen zeigten, konnten die verschiedenen Immunzytokine die Zytotoxizität der primären Zellen steigern. PBMCs, welche mit dem IL-12-basierten Immunzytokin anti-PDL1-sIL12 vorstimuliert wurden, lysierten bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 durchschnittlich 38,8 % \pm 1,8 % der K562 Tumorzellen und wiesen auch bei den niedrigeren *E:T-Ratios* im Vergleich zu den Kontrollansätzen eine 3- bis 4-fach gesteigerte Zytotoxizität auf. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 steigerten die Zytotoxizität der primären Immunzellen um das 4- bis 6-fache, so wurden bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 durchschnittlich 39,7 % \pm 1,7 % (anti-PDL1-RD-IL15) beziehungsweise 44,0 % \pm 1,7 % (RD-IL15-anti-PDL1) PI-gefärbte K562 Zellen detektiert. Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 hatte im Vergleich zu

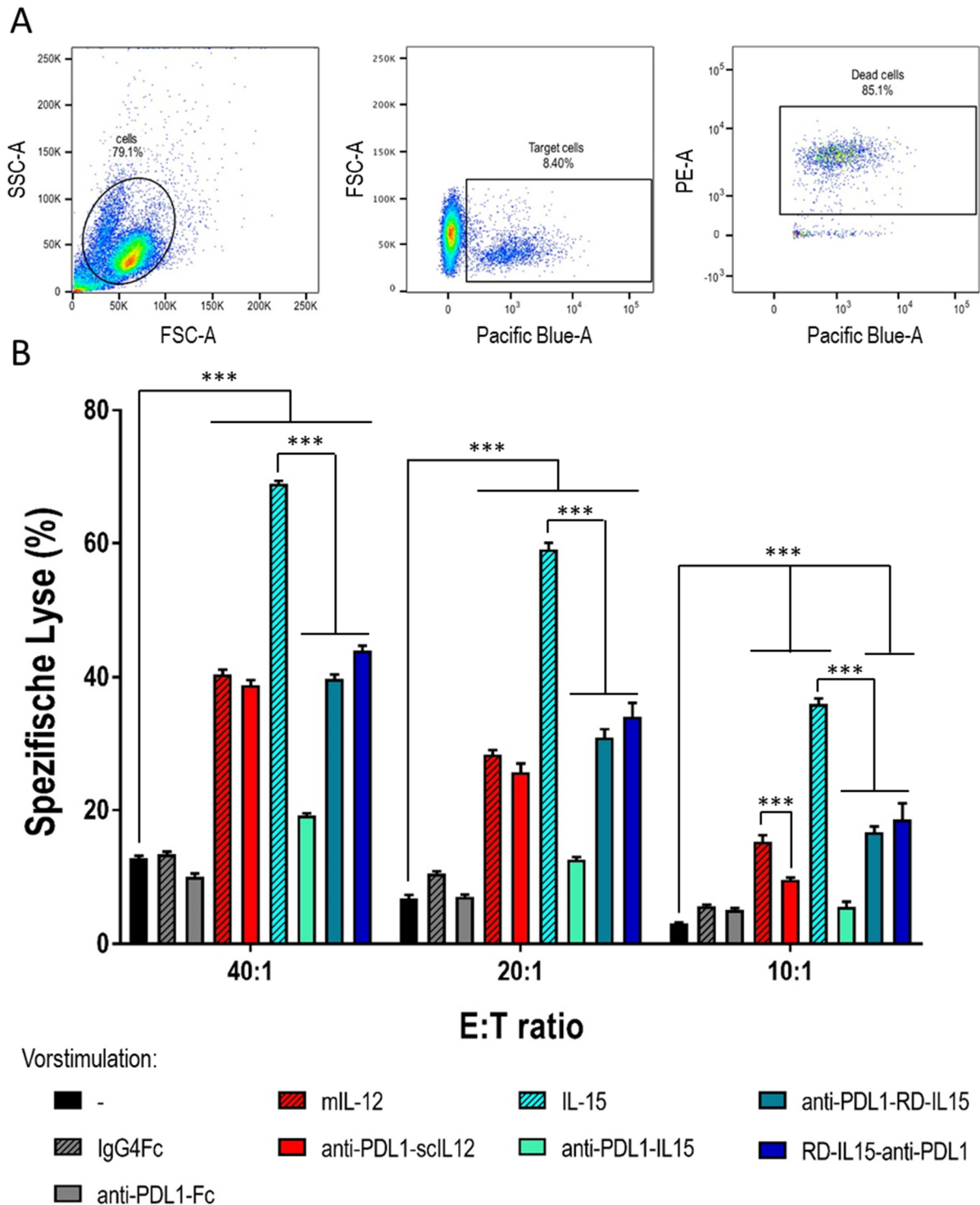


Abbildung 4.14: **Einfluss der Antikörperperforationsproteine auf die Zytotoxizität primärer Immunzellen.** Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und über Nacht mit murinem IL-12 (10 ng/ml), humanem IL-15 (10 ng/ml) oder äquimolaren Konzentrationen an Antikörperperforationsproteinen stimuliert. Am nächsten Tag wurden die PBMCs in verschiedenen Verhältnissen mit CV-gefärbten K562 Zellen für 2 h inkubiert und die spezifische Lyse wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. **(A) Gating-Strategie für den Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassay.** Durch die im Pacific Blue-Kanal gemessene CV-Färbung wird die Zielzellpopulation vorausgewählt. Im Anschluss können im PE-Kanal die PI/CV doppelt positiven, toten Zielzellen identifiziert werden. **(B) Spezifische Lyse von K562 Zellen durch Immunzytokin-vorstimulierte PBMCs.** Die Spezifische Lyse der K562 Zellen wurde durch Abzug der spontanen Lyse (K562 Zellen ohne Effektorzellen) ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten nach *block shift*-Korrektur. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Ergebnisse

den anderen Immunzytokinen einen geringeren Einfluss auf die Zytotoxizität der primären Immunzellen. PMBCs, welche mit 0,78 nM anti-PDL1-IL15 vorstimuliert wurden, lysierten bei einer *E:T-Ratio* von 40:1 durchschnittlich nur $19,2 \% \pm 0,9 \%$ der K562 Zellen. Bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 konnte keine signifikante Steigerung der Zytotoxizität durch Vorstimulation mit dem Immunzytokin anti-PDL1-IL15 mehr erzielt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Immunzytokine die Zytotoxizität primärer Immunzellen gegenüber K562 Tumorzellen steigern können. Da der anti-PDL1-Fc Miniantikörper die Zytotoxizität der primären Zellen nicht beeinflusste, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die hier gemessenen stimulatorischen Effekte der Immunzytokine allein auf die jeweils enthaltenen Zytokindomänen und nicht auf die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* zurückzuführen sind. Die fehlende Wirkung des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers in dem durchgeführten Zytotoxizitätsassay war nicht ganz unerwartet, da die Lyse der K562 Zellen durch die PD-1-negativen primären NK-Zellen vermittelt wird. In den zuvor durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen wiesen die untersuchten primären NK-Zellen selbst nach 48-stündiger Stimulation mit PHA-L nur eine geringe PD-1-Expression auf. In einem wie hier durchgeführten zweistündigen Zytotoxizitätsassay ist die Coinkubationsphase von Effektor- und Zielzellen somit zu kurz, um die Expression von PD-1 zu induzieren, wodurch die Blockade von PD-L1 keinen Effekt zeigen kann.

In einem zweiten Assay wurde die immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf primäre Immunzellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) evaluiert. Für die GLR wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMCs von zwei verschiedenen gesunden Spendern isoliert. Die PBMCs des ersten Spenders wurden als Effektorzellen in der GLR eingesetzt und mit CFSE nach Herstellerangaben gefärbt. Als Stimulatorzellen wurden mithilfe eines T-Zell Isolation-Kits die CD3-negativen Zellen aus den PBMCs des zweiten Spenders isoliert und mit 25 Gy bestrahlt. Anschließend wurden Stimulator- und Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und für 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Antikörperfusionsproteinen kokultiviert. Als Kontrollen wurden weitere Ansätze mit murinem IL-12 (20 ng/ml; 0,26 nM), humanem IL-15 (20 ng/ml; 1,56 nM) oder rekombinantem IgG4Fc Protein (100 nM) stimuliert. Effektorzellen, welche ohne CD3-negative Stimulatorzellen kultiviert wurden, dienten als Kontrolle für die basale T-Zellproliferation. Das zugrundeliegende Funktionsprinzip der GLR ist eine Alloreaktion. Die CD3-positiven T-Zellen der Effektorzellpopulation erkennen den fremden MHC-Komplex der CD3-negativen Stimulatorzellen, werden aktiviert und beginnen zu proliferieren. Üben die Antikörperfusionsproteine während der Alloreaktion einen zusätzlichen immunstimulatorischen Effekt auf die CD8⁺ T-Zellen aus, kann dies anhand einer erhöhten Proliferationsrate detektiert werden (Abbildung 4.15, A). Nach 7 Tagen wurden die Immunzellen geerntet und mit einem APC-gekoppelten CD8-spezifischen Antikörper gefärbt. In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurden die CD8⁺ T-Zellen als APC-positive

Zellpopulation identifiziert. Proliferierende CD8⁺ T-Zellen wurden dabei durch ein reduziertes CFSE-Signal (CFSE^{low}) von den ruhenden T-Zellen unterschieden (Abbildung 4.15, B).

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass nach siebentägiger Kultivierung mit IL-2-haltigem Medium durchschnittlich 38 % \pm 1,0 % der CD8⁺ T-Zellen eine oder mehrere Zellteilungen durchlaufen haben (Abbildung 4.15, C). Durch die Kokultivierung mit CD3-negativen Stimulatorzellen stieg der Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen auf circa 60 % \pm 1,7 % an. Während die Stimulation mit rekombinantem IgG4Fc-Kontrollprotein keinen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellproliferation hatte, erhöhte der anti-PDL1-Fc Miniantikörper den Anteil sich teilender CD8⁺ T-Zellen signifikant. Die immunstimulatorische Wirkung des Miniantikörpers war hierbei konzentrationsabhängig. Ab einer Antikörperkonzentration von 50 nM erreichte der Anteil an CFSE^{low} CD8⁺ T-Zellen jedoch ein Plateau von etwa 77,0 % \pm 3,8 %, welches durch eine weitere Steigerung der Miniantikörper-Konzentration nicht signifikant erhöht werden konnte. Das IL-12-basierte Immunzytokin anti-PDL1-sclIL12 und die IL-15-Superagonist enthaltenden Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 waren jeweils dazu in der Lage, die CD8⁺ T-Zellproliferation stärker zu induzieren als der anti-PDL1-Fc Miniantikörper. Durch Stimulation mit dem Immunzytokin anti-PDL1-sclIL12 oder dem IL-12 Kontrollzytokin stieg der Anteil proliferierender CD8⁺ T-Zellen auf etwa 85 % \pm 1,3 % (anti-PDL1-sclIL12) beziehungsweise 83 % \pm 1,1 % (IL-12) an. Rekombinantes IL-15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 induzierten sogar einen Anteil von bis zu 93 % aktiv proliferierenden CD8⁺ T-Zellen (IL-15: 93,5 % \pm 0,2 %, anti-PDL1-RD-IL15: 92,6 % \pm 0,6 %, RD-IL15-anti-PDL1: 93,5 % \pm 0,3 %). Das IL-15-basierte Immunzytokin anti-PDL1-IL15 hatte, wie auch in dem zuvor durchgeführten Zytotoxizitätsassay (siehe Abbildung 4.14), im Vergleich zu den anderen Immunzytokinen nur einen geringeren Einfluss auf die primären Immunzellen und stimulierte trotz der zusätzlichen IL-15-Domäne die CD8⁺ T-Zellproliferation nicht signifikant stärker als der anti-PDL1-Fc Miniantikörper. Beim Vergleich der Antikörperfusionsproteine wiesen die IL-15-Superagonist-basierten Immunzytokine somit den größten immunstimulatorischen Effekt auf die CD8⁺ T-Zellproliferation auf.

Die Daten der GLR belegen, dass der anti-PDL1-Fc Miniantikörper durch die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* dazu in der Lage ist, die TCR-vermittelte Aktivierung und somit die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen zu erhöhen. Mit Ausnahme von anti-PDL1-IL15 induzierten die Immunzytokine, bedingt durch die enthaltene Zytokindomäne, jeweils eine höhere CD8⁺ T-Zellproliferation als der anti-PDL1-Fc Miniantikörper. Ein synergistischer Effekt durch die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* und die proinflammatorischen Zytokindomänen konnte allerdings bei der Stimulation mit den Immunzytokinen unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht ermittelt werden. Die in den Immunzytokinen enthaltenen Zytokindomänen stimulieren die CD8⁺ T-Zellen offenbar bereits im maximal möglichen Ausmaß (durch die Zytokin-Kontrollen bestätigt), so dass die zusätzliche stimulatorische Wirkung des PD-L1-spezifischen scFv-Fragments überlagert wurde. Diese Hypothese

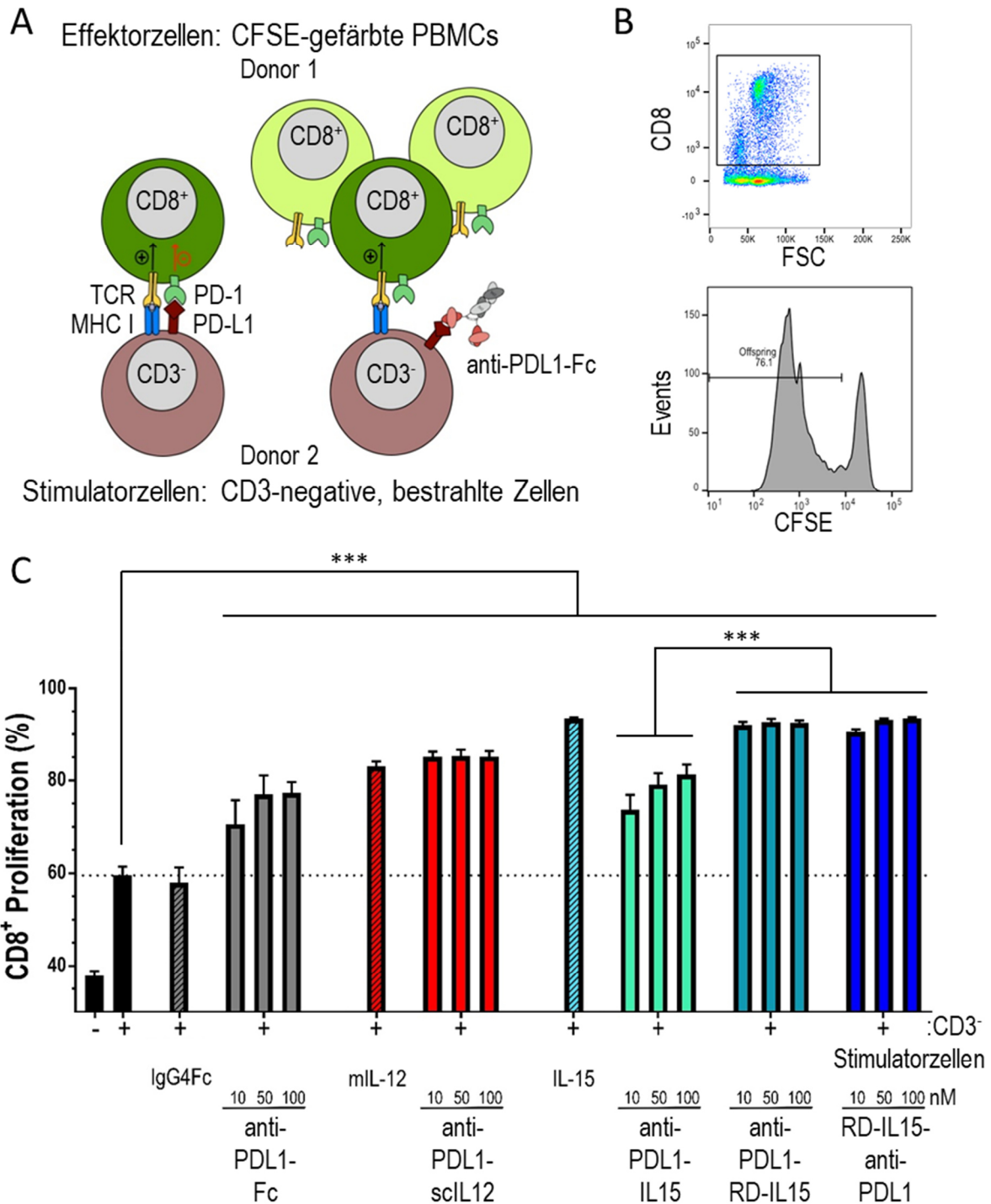


Abbildung 4.15: Einfluss der Antikörperperforationsproteine auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR). Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs von jeweils zwei gesunden Spendern isoliert. Die PBMCs des ersten Spenders wurden mit CFSE gefärbt und als Effektorzellen verwendet. Als Stimulatorzellen wurden die CD3-negativen PBMCs des zweiten Spenders isoliert und mit 25 Gy bestrahlt. Jeweils $1,5 \times 10^5$ Stimulator- und Effektorzellen wurden für 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Antikörperperforationsproteinen kokultiviert (10, 50 und 100 nM). Als Kontrollen wurden weitere Ansätze mit murinem IL-12 (20 ng/ml; 0,26 nM), humanem IL-15 (20 ng/ml; 1,56 nM) oder rekombinantem IgG4Fc Protein (100 nM) stimuliert. Effektorzellen ohne CD3-negative Stimulatorzellen wurden als Kontrolle für die basale T-Zellproliferation mitgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit einem APC-gekoppelten CD8-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A) Funktionsprinzip einer GLR.** Während der GLR werden die T-Zellen der Effektorzellpopulation durch den allogenen MHC-I-Komplex auf den Stimulatorzellen aktiviert und beginnen zu proliferieren. Immunstimulierende Moleküle induzieren eine Steigerung der T-Zellproliferationsrate. **(B) Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Analyse:** In den

durchflusszytometrischen Analysen werden die CD8⁺ T-Zellen als APC-positive Zellpopulation identifiziert. Proliferierende CD8⁺ T-Zellen werden durch eine reduzierte CFSE-Färbung von ruhenden T-Zellen unterschieden. **(C) Prozentualer Anteil an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen nach siebentägiger Cokultivierung mit CD3-negativen Stimulatorzellen.** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD nach *block shift*-Korrektur von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

wird durch die Ergebnisse der GLR gestützt, welche zeigen, dass die Immunzytokine anti-PDL1-sclL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 jeweils unabhängig von der eingesetzten Konzentration die CD8⁺ T-Zellproliferation gleichermaßen maximal induzierten.

4.1.7. Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 bis 4.2.3

In den Experimenten dargestellt in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 wurde die Funktionalität der in den Antikörperfusionsproteinen enthaltenen Antikörper- und Zytokindomänen untersucht. Die Aktivierung der IL-12- und IL-15-Rezeptorkomplexe durch die Zytokindomänen konnte in Immunoblot-Analysen indirekt über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT5 nachgewiesen werden. Die spezifische Bindung der Fusionsproteine an PD-L1 wurde zuerst für den Miniantikörper mittels Immunpräzipitation und anschließend für die Immunzytokine in einem Sandwich-ELISA nachgewiesen. In Durchflusszytometrie-Experimenten wurde zudem nachgewiesen, dass die Antikörperfusionsproteine auch an PD-L1 exprimiert auf der Oberfläche von Tumorzellen binden können.

In Abschnitt 4.2.3 wurde zunächst die PD-1- und PD-L1-Expression auf primären Immunzellen des peripheren Bluts durchflusszytometrisch nachgewiesen. Anschließend wurde die immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf die primären Immunzellen sowohl in einem Zytotoxizitätsassay als auch in einer GLR untersucht. In dem Zytotoxizitätsassay erhöhte die Vorstimulation der primären Immunzellen mit IL-12, IL-15 oder den Immunzytokinen die spezifische Lyse der PD-L1- und MHC-I-negativen Tumorzelllinie K562 signifikant. Da der PD-L1-spezifische Miniantikörper im Gegensatz zu den Zytokinen und Immunzytokinen keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der PBMCs hatte, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die stimulatorischen Effekte der Immunzytokine auf die Zytotoxizität der primären Immunzellen dabei hauptsächlich von den enthaltenen Zytokindomänen vermittelt wurden. In der durchgeführten GLR wurde die immunstimulatorische Funktion der generierten Antikörperfusionsproteine auf die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen während einer Alloreaktion untersucht. Der Miniantikörper anti-PDL1-Fc konnte die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen signifikant steigern, wodurch die Wirkung des PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragments als *Immune Checkpoint*-Inhibitor belegt werden konnte.

Die Zytokine IL-12, IL-15 und die Immunzytokine anti-PDL1-sclL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 erhöhten die CD8⁺ T-Zellproliferation jeweils signifikant mehr als der anti-PDL1-Fc Kontrollantikörper. Ein synergistischer Effekt durch die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* und die Stimulation mit den proinflammatorischen IL-12- oder IL-15-Zytokindomänen konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Immunzytokine wiesen anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 jeweils stärkere immunstimulatorische Effekte auf als anti-PDL1-sclL12. Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 zeigte sowohl im Zytotoxizitätsassay als auch in der GLR im Vergleich zu den anderen Immunzytokinen nur eine reduzierte Aktivität.

4.2. Expression von Immunzytokinen in ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen

4.2.1. Generierung Immunzytokine-kodierender lentiviraler Vektoren und Transduktion von CAR NK-92 Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden genetisch modifizierte CAR-Effektorzellen abgeleitet, welche durch Sekretion der zuvor charakterisierten PD-L1-spezifischen Immunzytokine dazu in die Lage versetzt werden, die Tumormikroumgebung und die sich darin befindenden endogenen Immunzellen zu beeinflussen. Als Ausgangspunkt für die Generierung Antikörperfusionsproteine-sekretierender CAR-Zellen wurde die in dieser Arbeitsgruppe entwickelte zytotoxische NK-Zelllinie NK-92/5.28.z verwendet. Die Zelllinie NK-92/5.28.z wurde ursprünglich unter GMP-Bedingungen mittels lentiviraler Transduktion von NK-92 Zellen mit einem Vektor, kodierend für einen ErbB2 (HER2)-spezifischen CAR, hergestellt. Nach der Transduktion wurde ein Einzelzellklon ausgewählt, welcher auch nach längerer Kulturzeit den CAR stabil und in hohen Mengen auf der Zelloberfläche aufweist (Schonfeld et al., 2015; Zhang et al., 2016). Der von NK-92/5.28.z Zellen exprimierte CAR (5.28.z) enthält ein von dem ErbB2-spezifischen monoklonalen Antikörper FRP5 abgeleitetes scFv-Antikörperfragment, das über eine CD8 α -abgeleitete *hinge*-Region an eine CD28-Transmembrandomäne und die intrazellulären signalleitenden Domänen von CD28 und CD3 ζ gekoppelt ist. Eine hohe antitumorale Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen wurde in der Vergangenheit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. In syngenesischen Mausmodellen mit murinen GL261/ErbB2 Glioblastomzellen führte die Behandlung mit den ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in einem Großteil der Versuchstiere zur Abstoßung subkutaner und intrakranialer Tumoren. Die Behandlung mit den NK-92/5.28.z Zellen induzierte zudem die Ausbildung eines immunologischen Langzeitschutzes, welcher das Anwachsen erneut injizierter Tumorzellen

verhindern konnte (Zhang et al., 2016). Inzwischen wird die Zelllinie NK-92/5.28.z in einer klinischen Phase I Studie (CAR2BRAIN; NCT03383978, clinicaltrials.gov) bei Patienten mit ErbB2-positiven Glioblastomen eingesetzt. Sie stellt somit für diese Arbeit ein klinisch relevantes zelluläres Modell dar.

Zunächst wurde die Expression von PD-1 und PD-L1 auf den CAR-Effektorzellen durchflusszytometrisch untersucht. Um dabei die mögliche Abhängigkeit der Expression von PD-1 und PD-L1 vom Aktivierungszustand der NK-92/5.28.z Zellen zu analysieren, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz für 48 h mit 20 ng/ml PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert (Abbildung 4.16). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, dass NK-92/5.28.z Zellen im unstimulierten Zustand (schwarze Linie) weder PD-1 noch PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach der unspezifischen Stimulierung mit PMA und Ionomycin für 48 h (gelbe Linie) wurde dagegen eine messbare Expression von PD-L1 auf den NK-92/5.28.z Zellen induziert. Die Expression von PD-1 wurde in aktivierten CAR NK-92 Zellen nur geringfügig erhöht.

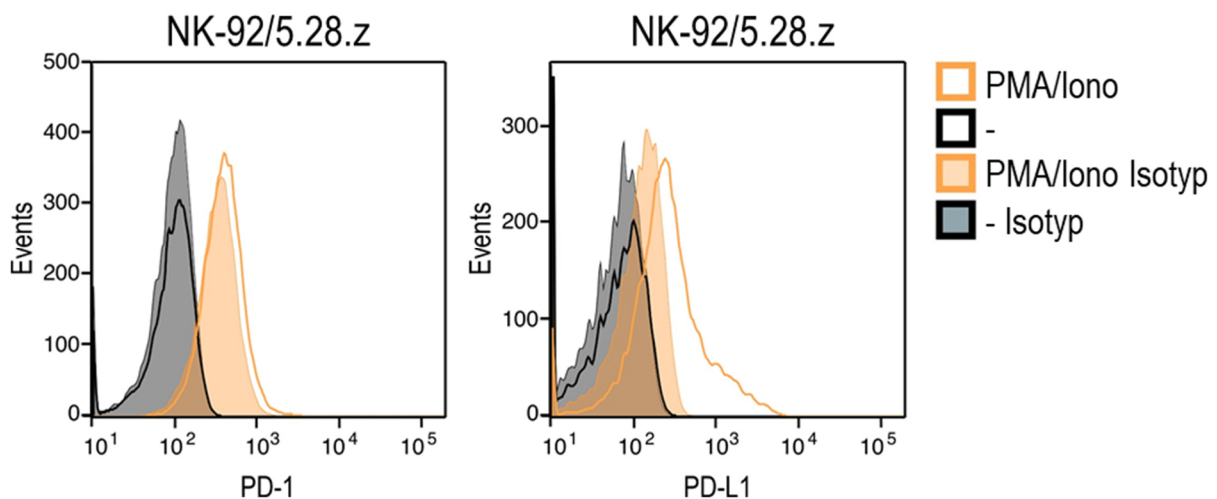


Abbildung 4.16: **PD-1- und PD-L1-Expression auf NK-92/5.28.z Zellen.** 1×10^6 NK-92/5.28.z Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten PD-1-Antikörper und einem APC-gekoppelten PD-L1-Antikörper gefärbt, um die basale PD-1- und PD-L1-Expression zu bestimmen. Zur Untersuchung der aktivierungsinduzierten Expression der immunregulatorischen Proteine wurden 1×10^6 NK-92/5.28.z Zellen/ml für 48 h mit 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Als Kontrollen wurden NK-92/5.28.z Zellen mit APC-/PE-gekoppelten, irrelevanten Antikörpern des gleichen Isotyps gefärbt.

Für die Expression von Immunzytokinen in CAR NK-92/5.28.z Zellen, wurden die codierenden Antikörpersequenzen in den lentiviralen Transfervektor pHR'SIN-cPPT-SIRW (pSIRW) eingebracht. In diesem Vektor werden die Antikörperperfusionsproteine unter der Kontrolle des *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV) Promotors konstitutiv exprimiert. Am 3'-Ende des Transgens befindet sich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. *internal ribosome entry site*, IRES), welche die Translation des Markergens iRFP vermittelt (Abbildung 4.17). HEK293T Zellen wurden mit den jeweiligen

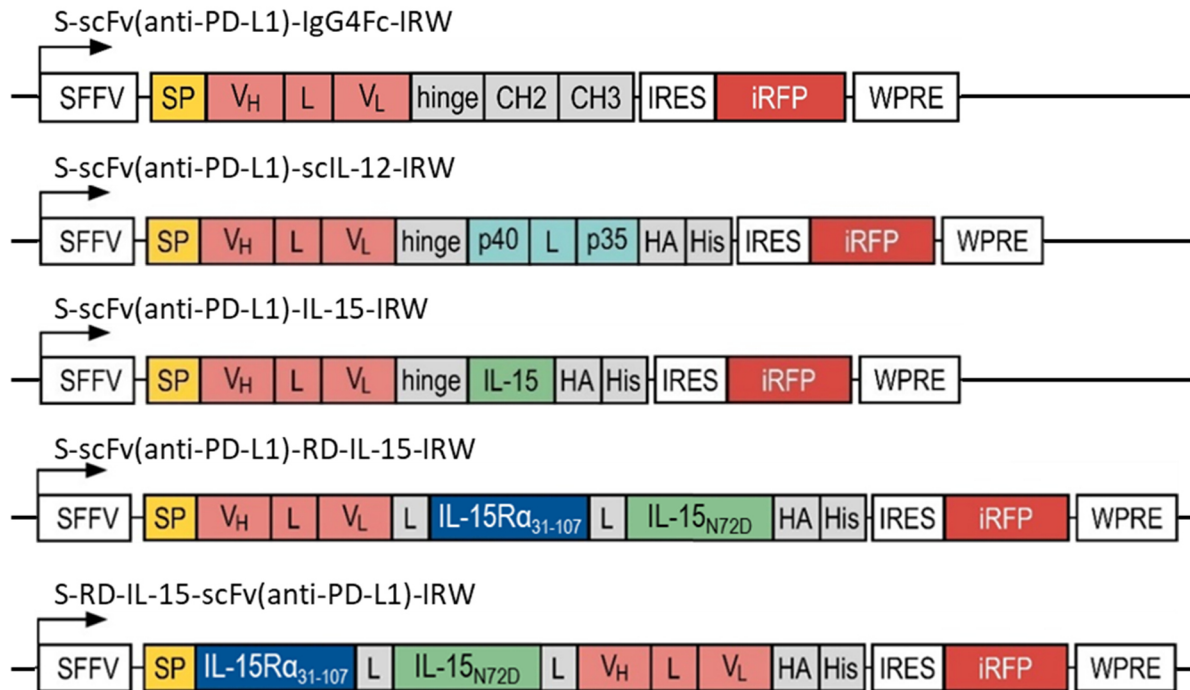


Abbildung 4.17: **Schematische Darstellung der Antikörperfusionsprotein-codierenden lentiviralen Vektoren.** Die Antikörperfusionsproteine werden unter der Kontrolle des *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV)-Promotors konstitutiv exprimiert. Am 3'-Ende des Transgens befindet sich eine *internal ribosome entry site* (IRES), welche die Translation des Markergens iRFP vermittelt. Weitere Erläuterungen zu dem Aufbau der Antikörperfusionsproteine siehe Abschnitt 4.1. SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, L: GS-Linker, hinge: IgG hinge-Region, p40: p40 Untereinheit von IL-12, p35: p35 Untereinheit von IL-12, IL-15_{N72D}: IL-15-Mutante, IL-15Rα₃₁₋₁₀₇: Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptors α, HA: HA-Tag, His: His₆-Tag, WPRE: *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*.

Immunzytokin-codierenden Transfervektoren und den Helferplasmiden (pCMV_ΔR8.91 und pMD2.G) transfiziert, um VSV-G pseudotypisierte, lentivirale Vektorpartikel zu produzieren. Vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände der HEK293T Zellen mit den enthaltenen Vektorpartikeln abgenommen. Anschließend wurden NK-92/5.28.z Zellen in Anwesenheit von 8 μM Polybren und 6 μM des Multi-Kinase-Inhibitors BX795 mit den Vektorpartikel-enthaltenden Kulturüberständen transduziert. Eine Woche nach Transduktion wurden erfolgreich transduzierte NK-92/5.28.z Zellen über die Expression des Markerproteins iRFP identifiziert und am FACSria Fusion Zellsortierer isoliert. Anschließend wurden die iRFP-positiven, sortierten NK-92/5.28.z Zellen wieder in Kultur genommen. Die transduzierten und sortierten NK-92/5.28.z Zellen wurden in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch auf die anhaltende Expression von iRFP überprüft und bei Bedarf ein weiteres Mal unter Verwendung des FACSria Fusion Zellsortierers sortiert. Der anfängliche Anteil von 0,5 % - 2,6 % iRFP-positiven CAR NK-92 Zellen nach Transduktion konnte durch die FACS-Zellsortierung auf bis zu 99,8 % in den Zellpools gesteigert werden (Abbildung 4.18).

Ergebnisse

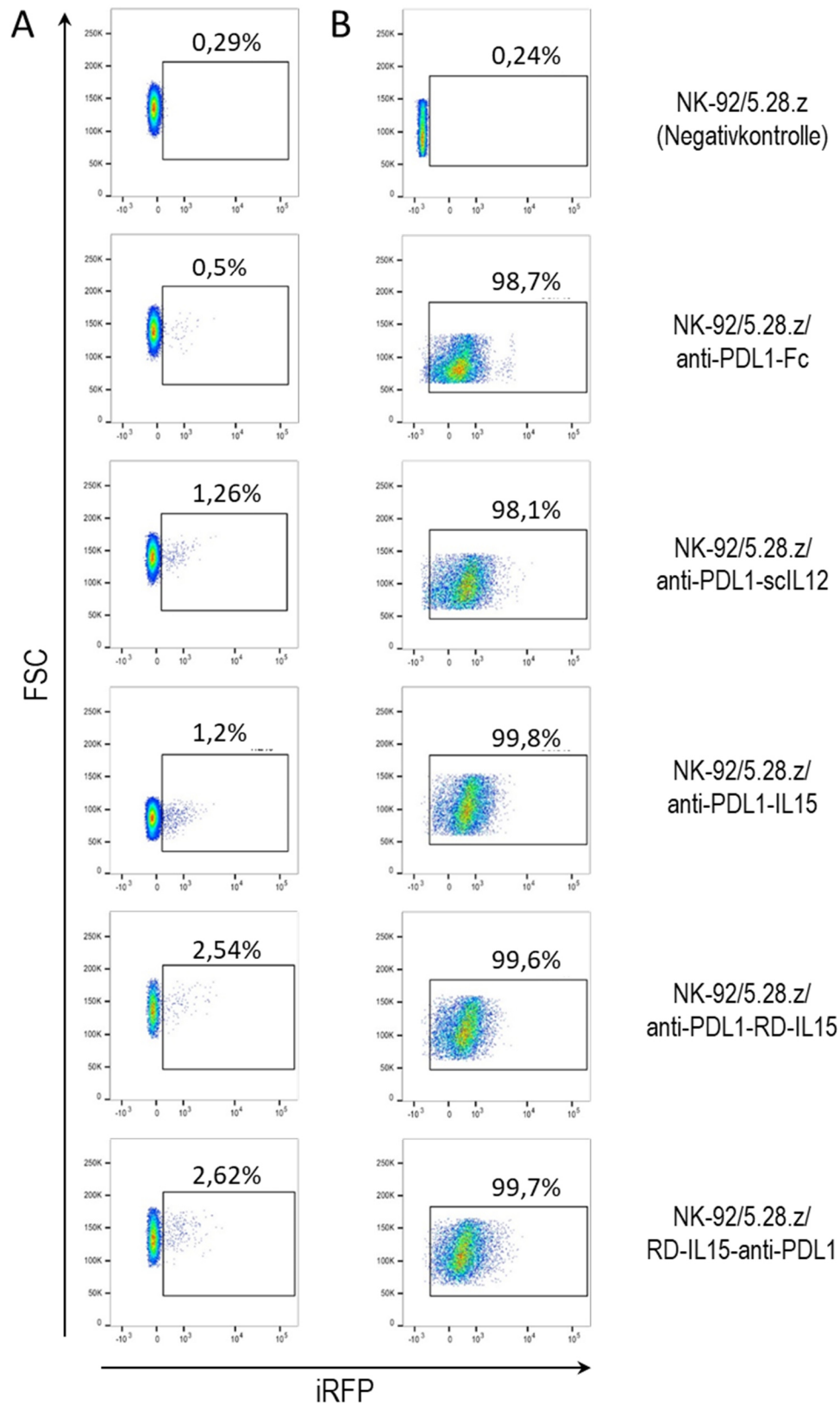


Abbildung 4.18: **Anreicherung lentiviral transduzierter CAR NK-92 Zellen mittels FACS-Zellsortierung.** Eine Woche nach Transduktion mit lentiviralen Vektorpartikeln wurden iRFP-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen mit einem FACSaria Fusion Zellsortierer isoliert. Die so erhaltenen Zellpools wurden weiter kultiviert. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der iRFP-positiven Zellen jeweils vor FACS-Zellsortierung (A) und danach (B). Untransduzierte NK-92/5.28.z Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle zur Einstellung des FACS-Gatings.

4.2.2. Sekretion von Antikörperfusionsproteinen durch lentiviral transduzierte NK-92/5.28.z Zellen

Die erfolgreich transduzierten CAR NK-92 Zellen wurden wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben anhand der Expression des Markerproteins iRFP isoliert. Um die Sekretion der Antikörperfusionsproteine durch die generierten Zellpools nachzuweisen, wurden mittels Immunpräzipitation Antikörperfusionsproteine aus den Zellkulturüberständen isoliert und angereichert. In anschließenden Immunoblot-Analysen wurden die in den Präzipitaten vorliegenden Antikörperfusionsproteine dann detektiert. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde mithilfe von Protein-G-gekoppelten Dynabeads präzipitiert. Als Negativkontrolle wurden Zellkulturüberstände von unveränderten NK-92/5.28.z Zellen mit Protein-G Dynabeads inkubiert. Die Präzipitate wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot mit einem Antikörper spezifisch für humanes IgG analysiert (Abbildung 4.19, A). Sowohl in der Negativkontrolle (Spur 1) als auch im Zellkulturüberstand der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen (Spur 2) wurden zwei Proteinbanden entsprechend der molekularen Masse von humanen IgG-Antikörpern (schwere Kette: 55 kDa, leichte Kette: 25 kDa) detektiert, die in dem als Medienzusatz eingesetzten humanen Plasma enthalten sind. Da der anti-PDL1-Fc Miniantikörper mit 50,7 kDa eine ähnliche molekulare Masse aufweist wie die schwere IgG-Antikörperkette, wurde der Miniantikörper nicht als separate Proteinbande im Präzipitat der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen detektiert. Aufgrund der Überlagerung der beiden Proteine war die 55 kDa Proteinbande im Zellkulturüberstand der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen jedoch deutlich stärker angefärbt als in der Negativkontrolle. Dies spricht dafür, dass NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen das Fusionsprotein tatsächlich in den Überstand sekretieren.

Für die Präzipitation der Immunzytokine wurden Protein-G-gekoppelte Dynabeads verwendet, welche zuvor mit 5 µg rekombinantem PD-L1-Fc Protein beladen wurden. Die Präzipitate wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot analysiert (Abbildung 4.19, B). Mit einem His₆-Tag-spezifischen Antikörper wurde in den Präzipitaten der konditionierten Medien der Immunzytokin-exprimierenden CAR NK-92 Zellen (Spuren 4-7) jeweils eine einzelne Proteinbande detektiert. Die molekularen Massen der in den Präzipitaten detektierten Proteine stimmten mit denen der zuvor in HEK293 Zellen als rekombinante Proteine produzierten Immunzytokine überein (siehe Abbildung 4.4). Im Präzipitat des Zellkulturüberstands der unveränderten NK-92/5.28.z Zellen (Spur 3) wurden mit dem His₆-Tag-spezifischen Antikörper keine Proteinbanden detektiert.

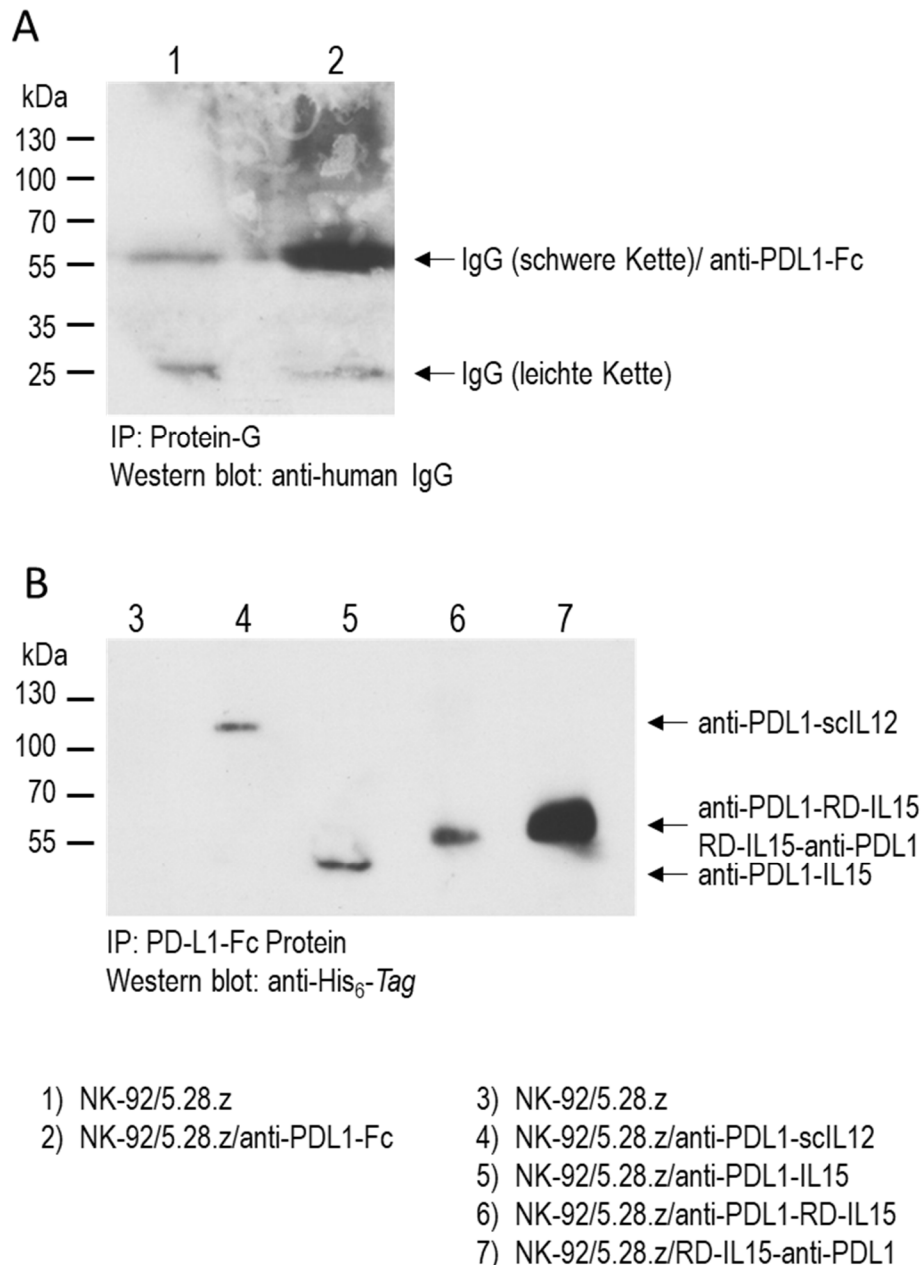


Abbildung 4.19: **Immunpräzipitation sekretierter Antikörperperfusionsproteine aus dem Überstand genmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen.** (A) Protein-G-gekoppelte Dynabeads wurden über Nacht bei 4 °C mit 20 ml Zellkulturüberstand von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden magnetisch mit den Dynabeads isoliert, eluiert und anschließend in einem Immunoblot mit einem HRP-gekoppelten anti-human IgG Antikörper detektiert. Als Kontrolle dienten Protein-G-gekoppelte Dynabeads, die über Nacht mit 20 ml Zellkulturüberstand der unmodifizierten NK-92/5.28.z Ausgangszellen inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte mit einem chemilumineszenten HRP-Substrat. (B) Protein-G-gekoppelte Dynabeads wurden mit 5 µg rekombinantem PD-L1-Fc Protein beladen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 20 ml Zellkulturüberstand der Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden magnetisch mit den Dynabeads isoliert, eluiert und anschließend in einem Immunoblot mit einem anti-His₆-Tag Antikörper detektiert. Als Kontrolle dienten Dynabeads, die über Nacht mit 20 ml Zellkulturüberstand der unmodifizierten NK-92/5.28.z Ausgangszellen inkubiert wurden. Die Bindung des anti-His₆-Tag-Antikörpers wurde durch Färbung mit einem HRP-gekoppelten Antikörper spezifisch für murines IgG und einem chemilumineszenten HRP-Substrat nachgewiesen.

Nach dem qualitativen Nachweis der Expression und Sekretion der Antikörperfusionsproteine durch die transduzierten CAR NK-92 Zellen, wurde die Menge der in den Überstand sekretierten Immunzytokine in einem Sandwich-ELISA quantifiziert. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurden jeweils 10^6 CAR NK-92 Zellen in 1 ml X-VIVO⁺⁺ Medium ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und in einem Sandwich-ELISA analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellkulturüberstände von unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen eingesetzt. Überstände der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Antikörperfusionsprotein-exprimierenden HEK293 Zellen dienten als Positivkontrollen. In den konditionierten Medien vorliegende Antikörperfusionsproteine wurden an auf einer ELISA-Platte immobilisiertes PD-L1-Fc Protein gebunden und anschließend mit einem Biotin-gekoppelten, Atezolizumab-spezifischen Antikörper und Streptavidin-HRP detektiert. Nach Inkubation mit TMB-Substratlösung wurde das in der Enzymreaktion entstandene Reaktionsprodukt photometrisch gemessen. Zur Quantifizierung wurden zum Vergleich verschiedene Mengen aufgereinigter rekombinanter Antikörperfusionsproteine (siehe Abschnitt 4.1.1) in einer Standardreihe eingesetzt. Mithilfe der Software GraphPad Prism 7.02 wurden die photometrisch bestimmten OD-Werte der Standardreihen zunächst normalisiert und anschließend mittels linearer Regression die Sättigungskurven für die Bindung der Antikörperfusionsproteine an PD-L1 bestimmt. Durch Interpolation der in den Proben gemessenen OD-Werte mit den zuvor ermittelten Sättigungskurven konnten die Konzentrationen der sekretierten Antikörperfusionsproteine bestimmt werden.

Nach der dreitägigen Kultivierung wurde in den Zellkulturüberständen der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen durchschnittlich eine Konzentration von $8,5 \text{ nM} \pm 6,4 \text{ nM}$ beziehungsweise $862 \text{ ng/ml} \pm 649 \text{ ng/ml}$ des anti-PDL1-Fc Moleküls detektiert (Abbildung 4.20). Die Immunzytokine anti-PDL1-sclIL12 ($9,2 \text{ nM} \pm 5,0 \text{ nM}$; $803 \text{ ng/ml} \pm 436 \text{ ng/ml}$), anti-PDL1-RD-IL15 ($9,1 \text{ nM} \pm 8,0 \text{ nM}$; $464 \text{ ng/ml} \pm 408 \text{ ng/ml}$) und RD-IL15-anti-PDL1 ($9,5 \text{ nM} \pm 8,6 \text{ nM}$; $485 \text{ ng/ml} \pm 439 \text{ ng/ml}$) wurden in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen. Dagegen wurde das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 nur in einer ca. 20-fach geringeren Menge von den CAR NK-92 Zellen sekretiert ($0,4 \text{ nM} \pm 0,3 \text{ nM}$; $16,6 \text{ ng/ml} \pm 12,5 \text{ ng/ml}$). Die stabil transfizierten HEK293 Zellen sekretierten die Antikörperfusionsproteine im Vergleich zu den CAR NK-92 Zellen in deutlich größeren Mengen. Nach 72 h der Kultivierung wurde eine durchschnittlich 10- bis 100-fach höhere Antikörper-Konzentration in den Zellkulturüberständen der HEK293 Zellen nachgewiesen (Tabelle 4.2.1).

Da die Menge der sekretierten Immunzytokine möglicherweise nicht nur von der Zellzahl und der Kultivierungsdauer der CAR NK-92 Zellen abhängt, sondern auch durch weitere Faktoren wie zum Beispiel dem Aktivierungszustand der Zellen oder Stressfaktoren potenziell beeinflusst wird, wurden die CAR NK-92 Zellen in weiteren Ansätzen unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt. Um den Einfluss der Aktivierung der natürlichen oder der CAR-vermittelten Zytotoxizität auf die Immunzytokin-Sekretion zu untersuchen, wurden die CAR NK-92 Zellen in einer *E:T-Ratio* von 1:1 mit K562 oder ErbB2-positiven

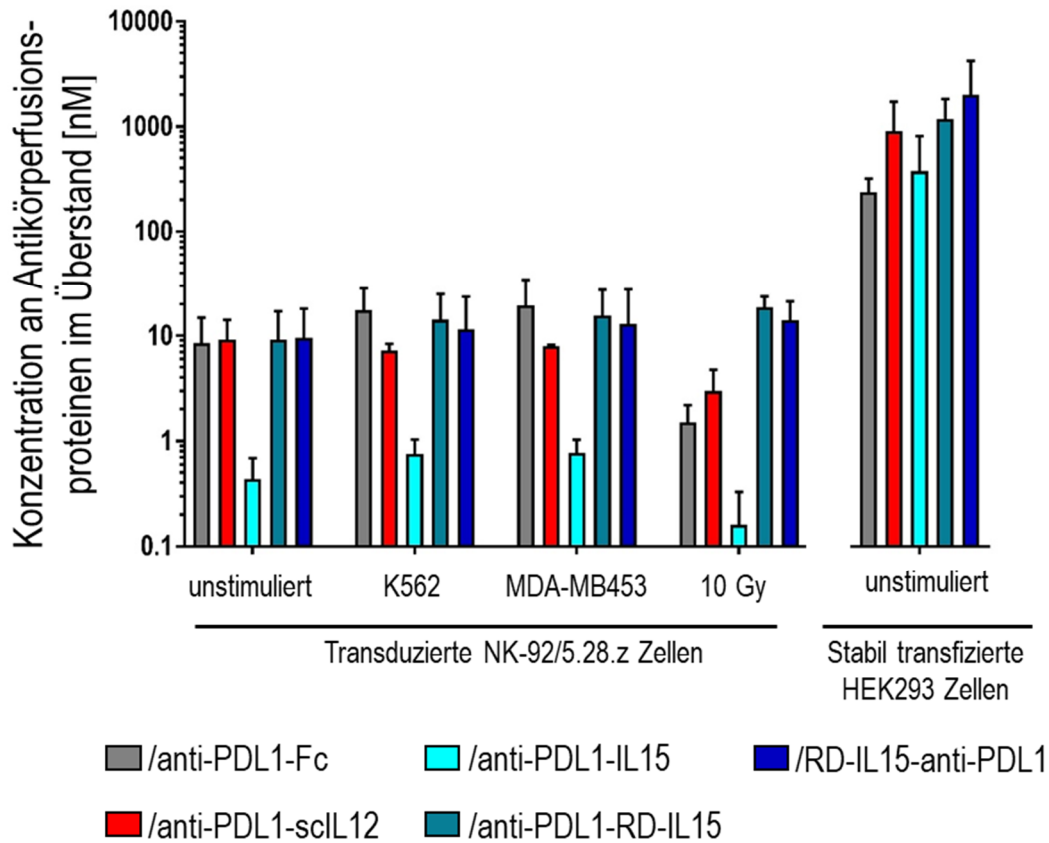


Abbildung 4.20: **Quantifizierung sekretierter Antikörperperfusionsproteine.** Jeweils 10^6 Antikörperperfusionsprotein-sekretierende CAR NK-92 Zellen wurden in 1 ml X-VIVO⁺⁺ ausgesät und kultiviert. Als Positivkontrolle dienen transduzierte Antikörperperfusionsprotein-produzierende HEK293 Zellen. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und in einem Sandwich-ELISA analysiert. Die sekretierten Antikörperperfusionsproteine wurden durch immobilisiertes PD-L1-Fc Protein gebunden und mittels eines Biotin-gekoppelten, Atezolizumab-spezifischen Antikörpers und Streptavidin-HRP detektiert. Nach Inkubation mit TMB-Substratlösung wurde das in der Enzymreaktion entstandene Reaktionsprodukt photometrisch gemessen. Mithilfe der Software GraphPad Prism 7.02 wurden die ermittelten OD-Werte zunächst normalisiert und anschließend mittels linearer Regression die Sättigungskurven für die Bindung der Antikörperperfusionsproteine an PD-L1-Fc bestimmt. Durch Interpolation der in den Proben gemessenen OD-Werte mit den zuvor ermittelten Sättigungskurven konnten die Konzentrationen der sekretierten Antikörperperfusionsproteine bestimmt werden. Um den Einfluss der Aktivierung der natürlichen oder der CAR-vermittelten Zytotoxizität auf die Immunzytokin-Sekretion zu untersuchen, wurden jeweils 10^6 CAR NK-92 Zellen in einer *E:T-Ratio* von 1:1 mit K562 oder ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen kokultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden die CAR NK-92 Zellen vor dem Aussäen mit 10 Gy bestrahlt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

MDA-MB453 Tumorzellen kokultiviert. In weiteren Ansätzen wurden die CAR NK-92 Zellen vor dem Aussäen mit 10 Gy bestrahlt. Eine solche Bestrahlung wird als Sicherheitsmaßnahme vor Infusion von NK-92 Zellen in klinischen Studien durchgeführt. Durch die Aktivierung oder Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Antikörperperfusionsprotein-Sekretion induziert (Abbildung 4.20, Tabelle 4.3.1). Nach der Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen wurde jedoch eine tendenzielle Abnahme der Sekretion der Antikörperperfusionsproteine anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-scIL12 und anti-PDL1-IL15 detektiert. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 wurden dagegen auch nach Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen in unveränderten Konzentrationen im Kulturüberstand nachgewiesen.

Tabelle 4.2.1: **Sekretion von Antikörperfusionsproteinen durch genmodifizierte CAR NK-92 Zellen.** Tabellarische Zusammenfassung der Daten aus Abbildung 4.21. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf 10^6 Zellen und 72 h Kultivierung. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

| NK-92/5.28.z | /anti-PDL1-Fc | /anti-PDL1-sclIL12 | /anti-PDL1-IL15 | /anti-PDL1-RD-IL15 | /RD-IL15-anti-PDL1 |
|--------------|--|--|--|---|--|
| unstimuliert | 8,5 \pm 6,4 nM 862 \pm 649 ng/ml | 9,2 \pm 5,0 nM 803 \pm 436 ng/ml | 0,4 \pm 0,3 nM 16,6 \pm 12,5 ng/ml | 9,1 \pm 8,0 nM 464 \pm 408 ng/ml | 9,5 \pm 8,6 nM 485 \pm 439 ng/ml |
| K562 | 17,5 \pm 11,0 nM 1775 \pm 1116 ng/ml | 7,2 \pm 1,1 nM 628 \pm 95,9 ng/ml | 0,8 \pm 0,3 nM 33,3 \pm 12,5 ng/ml | 14,2 \pm 10,8 nM 724 \pm 551 ng/ml | 11,6 \pm 12,1 nM 592 \pm 618 ng/ml |
| MDA-MB453 | 19,4 \pm 15,1 nM 1967 \pm 1531 ng/ml | 7,9 \pm 0,3 nM 690 \pm 26,2 ng/ml | 0,8 \pm 0,3 nM 33,3 \pm 12,5 ng/ml | 15,6 \pm 11,9 795 \pm 606 ng/ml | 13,0 \pm 14,8 nM 694 \pm 790 ng/ml |
| 10 Gy | 1,5 \pm 0,7 nM 152 \pm 70,9 ng/ml | 3,0 \pm 1,8 nM 262 \pm 157 ng/ml | 0,2 \pm 0,2 nM 8,3 \pm 8,3 ng/ml | 18,6 \pm 5,2 nM 949 \pm 265 ng/ml | 14,0 \pm 7,3 nM 714 \pm 372 ng/ml |
| HEK293 | /anti-PDL1-Fc | /anti-PDL1-sclIL12 | /anti-PDL1-IL15 | /anti-PDL1-RD-IL15 | /RD-IL15-anti-PDL1 |
| unstimuliert | 237 \pm 82,3 nM 24,0 \pm 8,3 μ g/ml | 901 \pm 825 nM 78,6 \pm 72 μ g/ml | 373 \pm 440 nM 15,5 \pm 18 μ g/ml | 1174 \pm 657 nM 59,9 \pm 34 μ g/ml | 2013 \pm 2223 nM 103 \pm 114 μ g/ml |

4.2.3. Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2

In Abschnitt 4.3.1 wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen, dass nicht-aktivierte ErbB2-spezifische CAR NK-92/5.28.z Zellen auf ihrer Zelloberfläche weder den *Immune Checkpoint*-Rezeptor PD-1 noch PD-L1 exprimieren. Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin für 48 h induzierte die Expression von PD-L1, aber nicht von PD-1. Mittels lentiviraler Transduktion von NK-92/5.28.z Zellen und anschließender durchflusszytometrischer Sortierung von iRFP-exprimierenden Zellen wurden Immunzytokin-exprimierende CAR NK-92 Zellpools generiert. In Abschnitt 4.3.2 wurde die Sekretion der verschiedenen Antikörperfusionsproteine durch die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen zunächst qualitativ in Immunoblot-Analysen nachgewiesen und anschließend in einem Sandwich-ELISA quantifiziert. Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 wurde im Vergleich zu den anderen Antikörperfusionsproteinen in deutlich geringeren Mengen von den CAR NK-92 Zellen sekretiert. Eine Stimulation mit Tumorzellen oder eine Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen beeinflusste die Sekretion der Antikörperfusionsproteine nicht in einem statistisch signifikanten Umfang.

4.3. Funktionelle Charakterisierung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen

4.3.1. Autokrine Stimulation der CAR NK-92 Zellen durch die Expression von Immunzytokinen

Die autokrine Stimulation von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen durch sekretiertes anti-PDL1-sclL12 wurde, ähnlich wie in den zuvor mit rekombinantem anti-PDL1-sclL12 durchgeführten Experimenten (siehe Abschnitt 4.1.5), indirekt über die Analyse der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4 untersucht. Für die Immunoblot-Analyse wurden NK-92/5.28.z Zellen und Immunzytokin-sekretierende NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen jeweils für 30 min in X-VIVO⁺⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von 5 ng/ml murinem IL-12 inkubiert. Anschließend wurden Lysate der CAR NK-92 Zellen hergestellt und in einem Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für STAT4, pSTAT4 (pY693) und γ -Tubulin analysiert (Abbildung 4.21). Im Zelllysat unstimulierter NK-92/5.28.z Zellen wurde nach Färbung mit dem pSTAT4-Antikörper keine spezifische Proteinbande detektiert. Erst nach Stimulation mit murinem IL-12 konnte eine pSTAT4-spezifische Proteinbande im Lysat der NK-92/5.28.z Zellen nachgewiesen werden. Die NK-92/5.25.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen wiesen dagegen bereits im unstimulierten Zustand phosphoryliertes STAT4 auf, wobei die zusätzliche Stimulation mit exogenem IL-12 das pSTAT4-Signal nicht weiter steigerte. Diese Ergebnisse weisen nach, dass das von

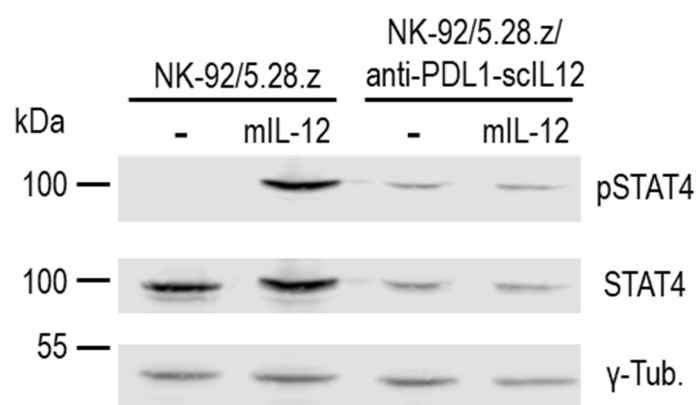


Abbildung 4.21: **Autokrine Stimulation von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-12 Zellen durch Sekretion des Immunzytokins anti-PDL1-sclL12.** Jeweils 3×10^6 NK-92/5.28.z und NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL12 Zellen wurden für 30 min in X-VIVO⁺⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von 5 ng/ml rekombinantem mIL-12 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die generierten Zelllysate wurden in einem Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für STAT4, pSTAT4 (pY693) und γ -Tubulin analysiert. Für die Detektion wurden jeweils Spezies-spezifische, Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, welche mithilfe eines *infrared imaging systems* nachgewiesen wurden.

den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 exprimierte anti-PDL1-sclL12 Immunzytokin autokrin auf die CAR NK-92 Zellen zurückwirkt und in diesen den IL-12-Signalweg aktiviert. Bei der Immunoblot-Analyse fiel auf, dass in den Lysaten der CAR NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen sowohl das pSTAT4 als auch das STAT4-Signal im Vergleich zu den NK.92/5.28.z Zellen reduziert war. Da das Signal der γ -Tubulin Ladekontrolle in den verschiedenen Proben vergleichbar war, kann vermutet werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors STAT4 in den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen reduziert war.

Um die mögliche autokrine Wirkung der IL-15- und IL-15-Superagonist-basierten Immunzytokine zu untersuchen, wurde in einer Immunoblot-Analyse der Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors STAT5 in den entsprechenden CAR NK-92 Zellen analysiert. Hierfür wurden NK-92/5.28.z und Immunzytokin-sekretierende NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen jeweils für 16 h in X-VIVO⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von 100 IU/ml IL-2 kultiviert. Als Positivkontrolle für die IL-15-induzierte Phosphorylierung von STAT5 wurden in einem weiteren Ansatz NK-92/5.28.z Zellen für 16 h in Abwesenheit von IL-2 kultiviert und anschließend für 30 min mit 5 ng/ml rekombinantem IL-15 stimuliert. Nach der Stimulation wurden die CAR NK-92 Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend in einem

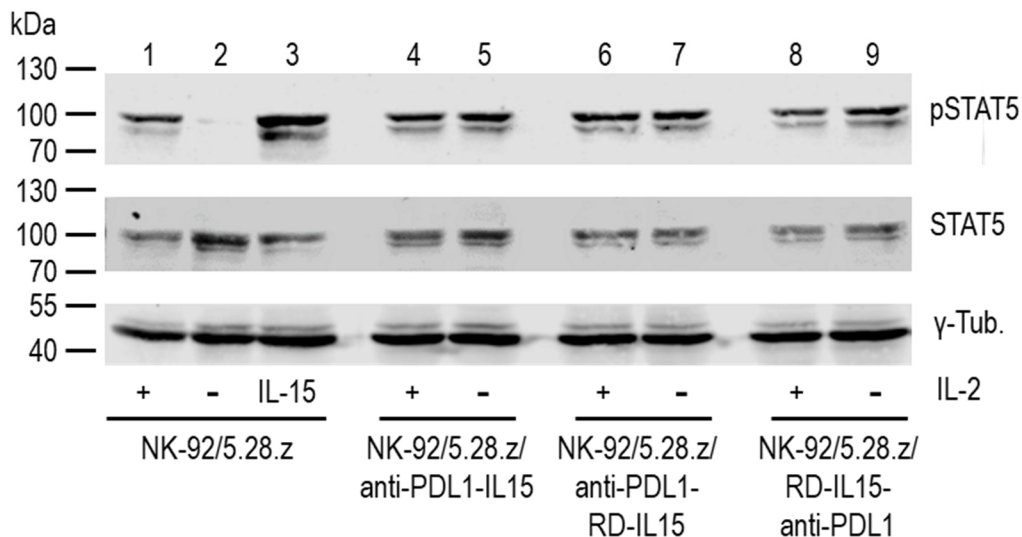


Abbildung 4.22: **Autokrine Stimulation von genmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen durch Sekretion von IL-15-basierten Immunzytokinen.** Jeweils 3×10^6 genmodifizierte und ursprüngliche NK-92/5.28.z Zellen wurden über Nacht in X-VIVO⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert. Als Positivkontrolle dienten unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen, welche nach dem Entzug von IL-2 für 30 min mit 5 ng/ml rekombinantem IL-15 stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die generierten Zelllysate wurden in einem Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für STAT5, pSTAT5 (pY694) und γ -Tubulin analysiert. Für die Detektion wurden jeweils Spezies-spezifische, Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, welche mithilfe eines *infrared imaging systems* nachgewiesen wurden.

Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für STAT5, pSTAT5 (pY694) und γ -Tubulin analysiert (Abbildung 4.22). Sowohl die ursprünglichen NK-92/5.28.z Zellen als auch die Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.5/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.5/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.5/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen nach Kultivierung mit 100 IU/ml IL-2 bereits pSTAT5 auf (Spuren 1, 4, 6 und 8). Durch den Entzug von IL-2 über 16 h wurde die Phosphorylierung von STAT5 in NK-92/5.28.z Zellen deutlich reduziert, konnte durch die Stimulation mit exogenem IL-15 jedoch wieder rekonstituiert werden (Spuren 2 und 3). Die Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen dagegen auch in Abwesenheit von exogenem IL-2 ein deutliches pSTAT5 Signal auf. Die Expression von STAT5 war in den Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen unverändert. Diese Ergebnisse weisen nach, dass die IL-15- und IL-15-Superagonist-basierten Immunzytokine tatsächlich autokrin auf die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen zurückwirken und in diesen den IL-15-Signalweg aktivieren.

4.3.2. Einfluss der Immunzytokin-Expression auf die Proliferation und die Zytotoxizität genmodifizierter CAR NK-92 Zellen

Die in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Immunoblot-Analysen zeigten, dass die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen durch die Expression der Immunzytokine autokrin stimuliert werden. In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurden die Effekte dieser autokrinen Stimulation auf Wachstum und Zytotoxizität der Zellen untersucht.

In einem Proliferationsassay wurde der Einfluss der Immunzytokin-Expression auf die Zellteilungsrate der CAR NK-92 Zellen analysiert. Hierzu wurden jeweils 2×10^4 NK-92/5.28.z und Antikörperfusionsprotein-sekretierende CAR NK-92/5.28.z Zellen in 200 μ l X-VIVO⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von 100 IU/ml IL-2 ausgesät und für 6 Tage kultiviert. Nach jeweils 24 h wurden Zellen aus einer Vertiefung geerntet und die Zellzahl wurde bestimmt (Abbildung 4.23). NK-92/5.28.z Zellen, welche in IL-2-haltigem Medium kultiviert wurden, wiesen eine durchschnittliche Verdopplungszeit T_d von $31,4 \text{ h} \pm 3,1 \text{ h}$ auf (Tabelle 4.3.1). Die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc ($31,0 \text{ h} \pm 3,2 \text{ h}$) und NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 ($31,0 \text{ h} \pm 6,2 \text{ h}$) Zellen zeigten während der Kultivierung in IL-2-haltigem Medium eine vergleichbare Proliferationsrate (Abbildung 4.23, A). Dagegen lagen nach sechstägiger Kultivierung die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen durchschnittlich in leicht höheren Zellzahlen

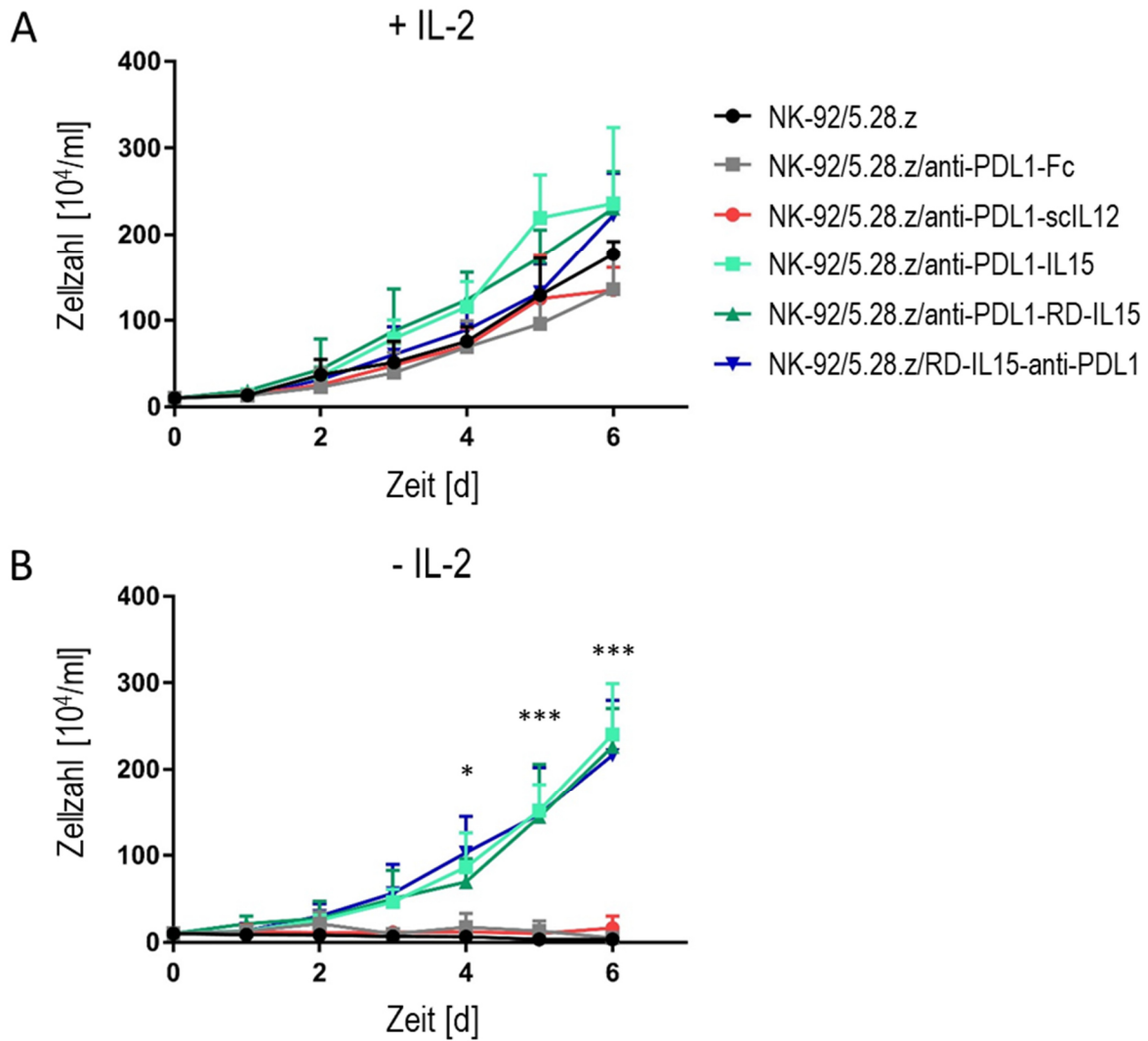


Abbildung 4.23: **Proliferation Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen.** Das Wachstum der Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen wurde in Kompletmedium (X-VIVO⁺⁺) mit 5 % humanem Plasma und 100 IU/ml IL-2 (**A**) oder in Abwesenheit von IL-2 (X-VIVO⁺) (**B**) untersucht. Es wurden jeweils 2×10^4 Zellen im entsprechenden Medium in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde täglich die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

vor als die unveränderten NK-92/5.28.z Zellen, und die berechnete Verdopplungszeit T_d war signifikant reduziert (Tabelle 4.3.1). Bei Kultivierung in IL-2-freiem Medium stellten sowohl NK-92/5.28.z als auch anti-PDL1-Fc- oder anti-PDL1-sclL12-sekretierende CAR NK-92 Zellen innerhalb von 48 h die Zellteilung ein (Abbildung 4.23, B). Da nach 72 h in den Proben der NK-92/5.28.z, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc und NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen abnehmende Zellzahlen detektiert wurden, konnten keine durchschnittlichen Verdopplungszeiten für diese Zellen ermittelt werden. Die anti-PDL1-IL15-, anti-PDL1-RD-IL15- oder RD-IL15-anti-PDL1-sekretierenden CAR NK-92 Zellen waren dagegen in der Lage,

Tabelle 4.3.1: **Verdoppelungszeiten T_d der Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen.** Aus den Daten der in Abbildung 4.23 gezeigten Experimente wurden die durchschnittlichen Verdoppelungszeiten T_d berechnet. Aufgeführt sind jeweils Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten. nd: nicht ermittelt, *: $p < 0,05$.

| NK-92/5.28.z | T_d [h] in X-VIVO ⁺⁺ (Komplettmedium) | T_d [h] in X-VIVO ⁺ (ohne IL-2) |
|--------------------|---|---|
| unmodifiziert | 31,4 \pm 3,1 | nd |
| /anti-PDL1-Fc | 31,0 \pm 3,2 | nd |
| /anti-PDL1-scIL12 | 31,0 \pm 6,2 | nd |
| /anti-PDL1-IL15 | 26,2 \pm 3,7 * | 25,6 \pm 3,7 |
| /anti-PDL1-RD-IL15 | 27,2 \pm 4,7 * | 25,3 \pm 1,6 |
| /RD-IL15-anti-PDL1 | 27,1 \pm 3,3 * | 28,3 \pm 4,1 |

über einen längeren Zeitraum ohne exogenes IL-2 zu überleben. Dabei wurde die Proliferation der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen durch den Entzug von IL-2 nicht signifikant beeinflusst, was an gleichbleibenden Verdopplungszeiten im Vergleich zu Proben mit 100 IU/ml IL-2 erkennbar war (Tabelle 4.3.1). Diese Ergebnisse weisen nach, dass die autokrine Stimulation durch die sekretierten IL-15-basierten Immunzytokine ausreichend ist, um CAR NK-92 Zellen ohne den Zusatz von exogenem IL-2 zu kultivieren.

In den nachfolgend durchgeführten Experimenten wurde analysiert, ob die Expression von anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 oder RD-IL15-anti-PDL1 und die damit verbundene autokrine Stimulation auch die Anreicherung von CAR NK-92 Zellen nach Transduktion ermöglicht. Hierzu wurden NK-92/5.28.z Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln, codierend für die IL-15-basierten Immunzytokine transduziert. Eine Woche nach Transduktion wurden die Zellen geerntet, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in IL-2-freiem Medium (X-VIVO⁺) wieder ausgesät. Während des IL-2-Entzugs wurde der Anteil an iRFP-exprimierenden Zellen regelmäßig durchflusszytometrisch bestimmt. Wie anhand von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 Zellen beispielhaft gezeigt, wurde während der Kultivierung in IL-2-freiem Medium eine kontinuierlich zunehmende Anzahl an iRFP-positiven Zellen detektiert (Abbildung 4.24). Nach etwa 21 Tagen Kultivierung in X-VIVO⁺ Medium erreichte der Anteil der transduzierten Zellen jedoch ein Plateau von etwa 88 %. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Da die Generierung eines 100 % iRFP-positiven Zellpools durch den Entzug von IL-2 nicht möglich war, kann vermutet werden, dass ab einem Anteil von ca. 88 % transduzierten Zellen die IL-15-basierten Immunzytokine in ausreichenden Mengen sekretiert werden, um auch umgebende unmodifizierte NK-92 Zellen zu stimulieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-

Ergebnisse

RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen durch Expression der IL-15-basierten Immunzytokine autokrin stimuliert werden und IL-2-unabhängig kultiviert werden können. Zudem weisen diese Ergebnisse auch darauf hin, dass die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen die Immunzytokine in ausreichenden Mengen sekretieren, um auch umgebende Zellen stimulieren zu können.

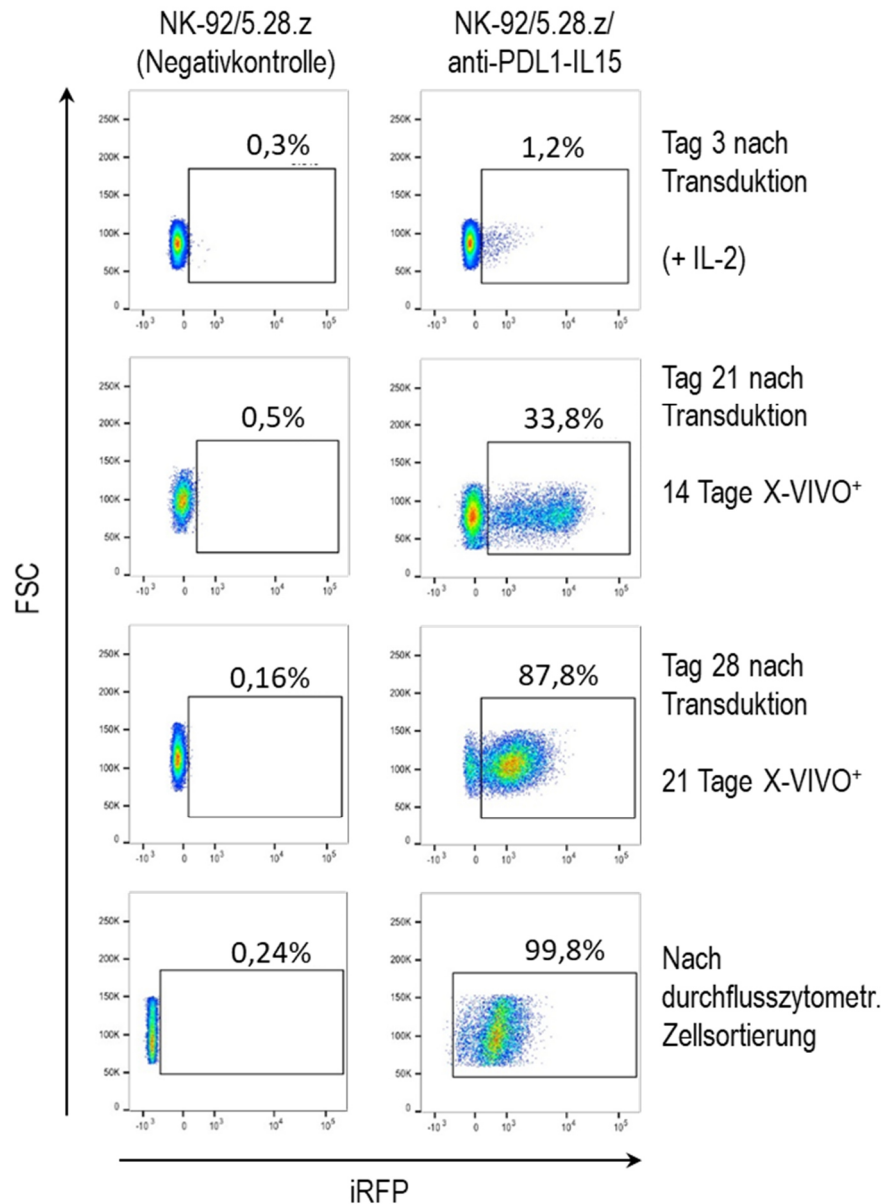


Abbildung 4.24: **Selektion lentiviral transduzierter NK-92/5.28.z Zellen durch den Entzug von IL-2.** Eine Woche nach Transduktion wurden unsortierte NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend in IL-2 freiem X-VIVO⁺ wieder in Kultur genommen. Während des IL-2 Entzugs wurde die iRFP-Expression des Zellpools regelmäßig durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen, welche in X-VIVO⁺⁺ mit 100 IU/ml IL-2 kultiviert wurden. FACS-sortierte iRFP-positive NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 Zellen dienten als Positivkontrolle.

Nachfolgend wurde unter Verwendung durchflusszytometrisch sortierter Zellpools analysiert, ob die autokrine Stimulation durch die Immunzytokine auch die Zytotoxizität der genmodifizierten CAR NK-92 Zellen beeinflusst. Hierfür wurden die entsprechenden CAR NK-92 Zellen in zweistündigen Zytotoxizitätsassays mit verschiedenen Tumorzelllinien als Zielzellen untersucht. Für die Analyse der natürlichen Zytotoxizität wurden die etablierten MHC-I-negativen Zelllinien K562 und C1R-neo als Zielzellen eingesetzt. Die CAR-vermittelte Zytotoxizität wurde mit ErbB2-positiven MDA-MB453 und ErbB2-negativen MDA-MB468 Brustkrebszellen als Zielzellen analysiert. Als Kontrolle dienten die unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen.

Durch die natürliche Zytotoxizität der ErbB2-spezifischen CAR NK-92/5.28.z Zellen wurden bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 innerhalb von 2 h durchschnittlich $60,9 \% \pm 5,4 \%$ der K562 Zellen lysiert (Abbildung 4.25, A). Die Expression des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers oder der Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 beeinflusste die Zytotoxizität der CAR NK-92 Zellen gegenüber K562 nicht signifikant. Die anti-PDL1-sclL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen wiesen dagegen als einzige der untersuchten CAR NK-92 Zellpopulationen eine signifikant reduzierte natürliche Zytotoxizität auf. Vor allem bei höheren *E:T-Ratios* war eine verminderte Lyse der K562 Zellen detektierbar. So wurden bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 durchschnittlich nur $22,2 \% \pm 11,2 \%$ der K562 Zellen durch die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen abgetötet. Die ebenfalls MHC-I-negative B-Zelllinie C1R-neo war weniger sensitiv gegenüber der Lyse durch die CAR NK-92 Zellen. In Ansätzen mit unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen wurden bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 in den nachfolgenden FACS-Analysen durchschnittlich $28,5 \% \pm 0,1 \%$ apoptotische C1R-neo Zellen detektiert (Abbildung 4.25, B). Interessanterweise wurde der zuvor bei K562 Tumorzellen beobachtete negative Effekt der anti-PDL1-sclL12 Expression auf die natürliche Zytotoxizität bei der Lyse von C1R-neo Zellen nicht beobachtet. Die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden NK-92/5.28.z Zellen lysierten die C1R-neo Zellen jeweils in einem vergleichbaren Umfang wie die NK-92/5.28.z Ausgangszellen. Bei den MHC-I-exprimierenden aber ErbB2-negativen Brustkrebszellen MDA-MB468 wurde eine ähnliche Reduktion der Lyse durch die Expression von anti-PDL1-sclL12, wie zuvor bei K562 Zellen beobachtet. Die unveränderten NK-92/5.28.z Zellen lysierten bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 durchschnittlich $20,5 \% \pm 4,3 \%$ der MDA-MB468 Zellen (Abbildung 4.25, D). NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen lysierten bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 dagegen durchschnittlich nur $4,2 \% \pm 0,4 \%$ der MDA-MB468 Zellen. Die Expression des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers oder der IL-15-basierten Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 hatte keinen Effekt auf die Zytotoxizität der CAR NK-Zellen gegenüber MDA-MB468 Zellen.

Auch im Fall der CAR-vermittelten Zytotoxizität gegenüber MDA-MB453 Zellen wurde im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen eine reduzierte Lyse durch die anti-PDL1-sclL12-sekretierenden

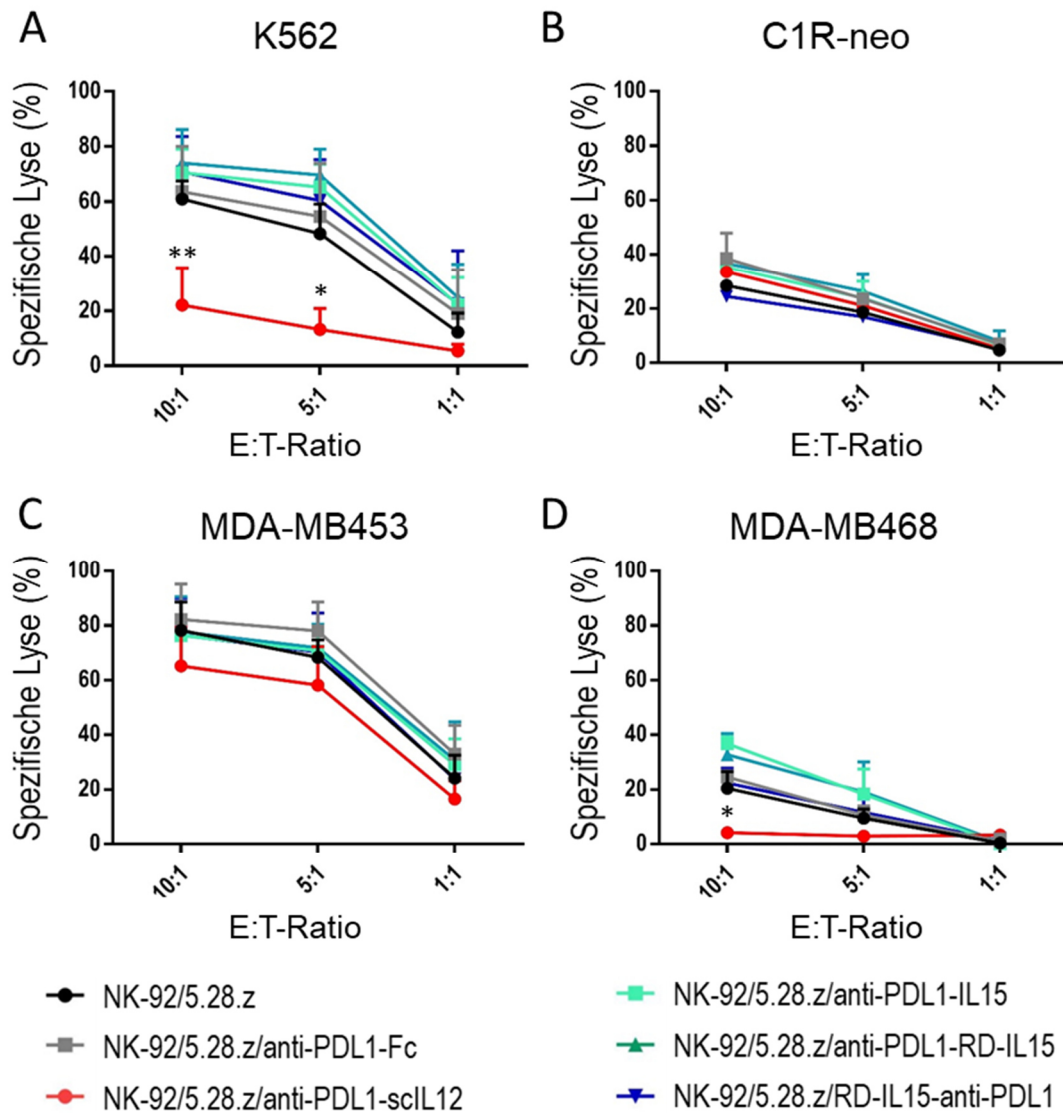


Abbildung 4.25: **Natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität der Antikörperperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen.** (A-B) In Zytotoxizitätsassays mit den MHC-I negativen Tumorzelllinien K562 und C1R-neo wurde untersucht, ob die natürliche Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen durch die Sekretion von Antikörperperfusionsproteinen beeinflusst wird. (C-D) Die spezifische CAR-vermittelte Zytotoxizität der Antikörperperfusionsprotein-sekretierenden NK-92/5.28.z Zellen wurde in Zytotoxizitätsassays mit den ErbB2-exprimierenden Brustkrebszellen MDA-MB453 analysiert. Als Kontrolle wurde die ErbB2-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB468 mitgeführt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

CAR NK-92 Zellen beobachtet, wobei dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 4.25, C). Während die unveränderten ErbB2-spezifischen CAR NK-92/5.28.z Zellen bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 durchschnittlich $78,3 \% \pm 8,5 \%$ der MDA-MB-453 Zellen lysierten, konnten bei den anti-PDL1-sclL12-sekretierenden CAR NK-Zellen nur $65,2 \% \pm 11,9 \%$ apoptotische MDA-MB453 Zellen detektiert werden. Sowohl die Miniantikörper- (Lyse von $82,2 \% \pm 10,6 \%$) als auch die anti-PDL1-15- (Lyse von $76,4 \% \pm 10,1 \%$), anti-PDL1-RD-IL15- (Lyse von $77,7 \% \pm 10,5 \%$) und RD-IL15-anti-PDL1- (Lyse von $76,5 \% \pm 11,0 \%$) sekretierenden CAR NK-92 Zellen wiesen jeweils eine zu den parental NK-92/5.28.z

Zellen vergleichbare Zytotoxizität gegenüber MDA-MB453 Zellen auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression der Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 die Zytotoxizität der CAR NK-92 Zellen nicht beeinflusst. Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen eine statistisch signifikant reduzierte natürliche Zytotoxizität gegenüber K562 und MDA-MB468 Zellen und eine leicht reduzierte CAR-vermittelte Zytotoxizität auf.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Reduktion der natürlichen Zytotoxizität der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen durch die anhaltende Aktivierung des IL-12-Signalwegs induziert wird, wurden unveränderte NK-92/5.28.z Zellen für 14 Tage mit 10 ng/ml oder 300 ng/ml IL-12 stimuliert. In weiteren Ansätzen wurden NK-92/5.28.z Zellen nach der 14-tägigen Stimulierung mit IL-12 mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend zur Erholung für weitere 5 Tage in X-VIVO⁺⁺ ohne IL-12 kultiviert. Als Kontrolle dienten NK-92/5.28.z Zellen, welche in X-VIVO⁺⁺ Medium unter normalen Kulturbedingungen gehalten wurden. Die verschiedenen stimulierten NK-92/5.28.z Zellen wurden jeweils in zweistündigen Zytotoxizitätsassays in einer *E:T-Ratio* von 10:1 mit K562, MDA-MB468 und MDA-MB453 Tumorzellen eingesetzt (Abbildung 4.26). Dabei zeigte sich, dass durch die 14-tägige Stimulation mit IL-12 die natürliche Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen tatsächlich signifikant reduziert wurde. Während unstimulierte NK-92/5.28.z Zellen durchschnittlich 74 % \pm 9,1 % der K562 Zellen lysierten, wurden in den Ansätzen mit IL-12-stimulierten CAR NK-92 Zellen durchschnittlich nur noch 33,8 % \pm 8,4 % (10 ng/ml IL-12) beziehungsweise 25,1 % \pm 4,8 % (300 ng/ml IL-12) apoptotische K562 Zellen detektiert. Auch die ErbB2-negativen MDA-MB468 Brustkrebszellen wurden durch IL-12-stimulierte CAR NK-92 Zellen weniger effektiv lysiert (10 ng/ml IL-12: Lyse von 3,9 % \pm 3,4 %; 300 ng/ml IL-12: Lyse von 4,4 % \pm 2,8 %) als durch die unstimulierten NK-92/5.28.z Zellen (21,3 % \pm 6,6 %). Bei der CAR-vermittelten Lyse der MDA-MB453 Zellen war der negative Effekt der IL-12-Stimulation jedoch weniger stark ausgeprägt. NK-92/5.28.z Zellen lysierten im unstimulierten Zustand durchschnittlich 76,4 % \pm 4,3 % der MDA-MB453 Zellen, mit IL-12 kultivierte NK-92/5.28.z Zellen lysierten jeweils ungefähr 65 % der ErbB2-exprimierenden Tumorzellen.

Die Zytotoxizität der CAR NK-92 Zellen konnte abhängig von der zuvor eingesetzten IL-12-Konzentration durch die Kultivierung in IL-12-freiem Medium teilweise wiederhergestellt werden (Abbildung 4.26). NK-92/5.28.z Zellen, welche für 14 Tage mit 10 ng/ml IL-12 stimuliert wurden, zeigten nach der fünftägigen Erholungsphase ohne IL-12 eine natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität vergleichbar mit der von NK-92/5.28.z Zellen unter normalen Kulturbedingungen. NK-92/5.28.z Zellen, die hingegen mit einer wesentlich höheren Konzentration an IL-12 (300 ng/ml) kultiviert wurden, zeigten auch nach der Erholungsphase noch eine reduzierte natürliche (67,3 % \pm 17,8 % lysierte K562 Zellen) und CAR-vermittelte Zytotoxizität (56,7 % \pm 2,5 % lysierte MDA-MB453 Zellen).

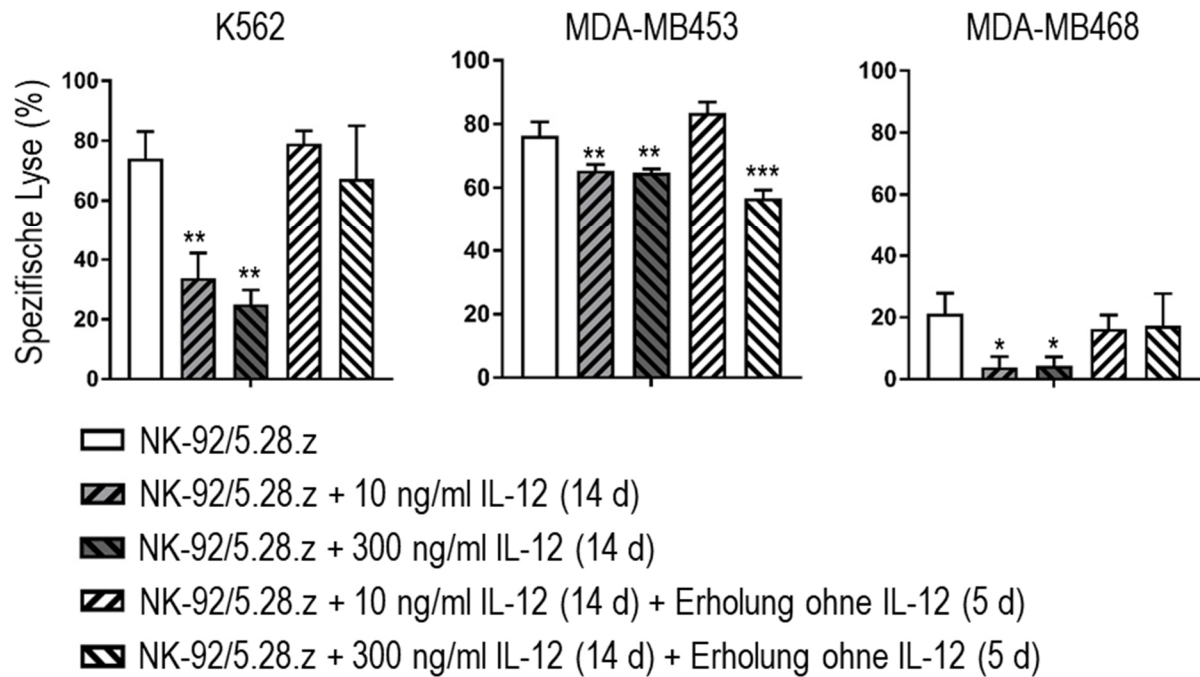


Abbildung 4.26: **Einfluss der Stimulation mit IL-12 auf die Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen.** NK-92/5.28.z Zellen wurden für 14 Tage in X-VIVO⁺⁺ mit 10 ng/ml oder 300 ng/ml IL-12 kultiviert. Hierfür wurde jeden dritten Tag das Zellkulturmedium gewechselt, um die IL-12-Konzentrationen aufrechtzuerhalten. In einem weiteren Ansatz wurden NK-92/5.28.z Zellen nach der 14-tägigen Stimulation mit IL-12 für weitere 5 Tage ohne IL-12 kultiviert. Als Kontrolle wurden NK-92/5.28.z Zellen verwendet, welche unter normalen Kulturbedingungen gehalten wurden. Die Zellen aus den verschiedenen Stimulationsansätzen wurden jeweils in einem zweistündigen Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Für die Analyse der natürlichen Zytotoxizität wurden die NK-92/5.28.z Zellen in einer *E:T-Ratio* von 10:1 mit Calcein Violet-gefärbten K562 Zellen coinokubiert. Für die Ermittlung der CAR-vermittelten Zytotoxizität wurden ErbB2-positive MDA-MB453 und ErbB2-negative MDA-MB468 Brustkrebszellen verwendet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3.3. Stimulation umgebender Immunzellen durch von CAR NK-92 sekretierte Immunzytokine

In den in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 dargestellten Experimenten wurde nachgewiesen, dass die von den genetisch modifizierten CAR NK-92 Zellen sekretierten Immunzytokine funktional sind und autokrin auf die produzierenden Zellen zurückwirken können. Nachfolgend wurde untersucht, ob die sekretierten Immunzytokine auch umgebende Immunzellen parakrin stimulieren. Um solche immunstimulatorischen Effekte der Immunzytokine unabhängig von eventuellen Einflüssen von Zell-Zell-Kontakten analysieren zu können, wurden die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen räumlich durch einen Transwell-Einsatz getrennt mit PBMCs gesunder Spender kokultiviert. Die von den CAR NK-92 Zellen sekretierten Immunzytokine können dabei frei durch die Membran des Transwell-Einsatzes diffundieren und auf die primären Immunzellen im abgetrennten Zellkulturkompartiment wirken. Die

genmodifizierten CAR NK-92 Zellen verbleiben dagegen im Transwell-Einsatz und können so die separierten primären Immunzellen nicht direkt beeinflussen.

In einem Transwell-Zytotoxizitätsassay wurde zunächst untersucht, ob die von den genmodifizierten CAR NK-92 Zellen sekretierten Immunzytokine die Zytotoxizität umgebender Immunzellen beeinflussen. Hierzu wurden PBMCs gesunder Spender isoliert und in einer 24-Well-Platte als Effektorzellen ausgesät, während in die Transwell-Einsätze die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen vorgelegt wurden. Die Transwell-Einsätze mit den CAR NK-92 Zellen wurden anschließend in die 24-Well-Platte eingesetzt und über Nacht über die Membran getrennt mit den PBMCs kokultiviert. Als Kontrollen wurden PBMCs allein oder mit unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen in einem Transwell-Einsatz kokultiviert. Um den Einfluss definierter Konzentrationen von Zytokinen auf die PMBCs zu untersuchen, wurden die Spender-Lymphozyten zudem in separaten Ansätzen mit 10 ng/ml murinem IL-12 (0,13 nM), 10 ng/ml humanem IL-15 (0,78 nM) oder den äquimolaren Mengen an aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen in Abwesenheit von NK-92/5.28.z Zellen über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden Calcein Violet-gefärbte K562 Zellen als Zielzellen in einer *E:T-Ratio* von 20:1 zu den PBMCs hinzugefügt. Die Transwell-Einsätze mit den CAR NK-92 Zellen wurden dabei während des Zytotoxizitätsassays in der 24-Well-Platte belassen (Abbildung 4.27, A). Nach 2 h wurden die Zellen aus der 24-Well-Platte geerntet und mit PI gefärbt. Die lysierten Zielzellen wurden anschließend durchflusszytometrisch als CV/PI doppelt positive Zellpopulation identifiziert.

Innerhalb der zweistündigen Kokultivierung lysierten unstimulierte PBMCs in Abwesenheit von Immunzytokinen und CAR NK-Zellen durchschnittlich 13,1 % \pm 4,6 % der K562 Zellen (Abbildung 4.27, B). Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper (12,6 % \pm 5,0 %) und als Kontrollprotein eingesetztes rekombinantes IgG4Fc Protein (13,0 % \pm 5,6 %) hatten, ähnlich wie bei den zuvor durchgeführten Zytotoxizitätsassays (siehe Abbildung 4.14), keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der primären Immunzellen. Dagegen wurde die spezifische Lyse der K562 Tumorzellen durch die Vorstimulation der PBMCs mit den Zytokinen IL-12 (Lyse von 32,7 % \pm 9,5 %) und IL-15 (Lyse von 34,4 % \pm 7,5 %), sowie mit den aufgereinigten rekombinanten Immunzytokinen anti-PDL1-sclIL12 (Lyse von 27,9 % \pm 7,8 %), anti-PDL1-IL15 (Lyse von 19,0 % \pm 2,8 %), anti-PDL1-RD-IL15 (Lyse von 29,5 % \pm 8,4 %) und RD-IL15-anti-PDL1 (Lyse von 28,8 % \pm 6,0 %) jeweils signifikant gesteigert. Die Kokultivierung mit den unveränderten NK-92/5.28.z Zellen beeinflusste die Zytotoxizität der PBMCs nicht (Lyse von 11,9 % \pm 3,9 %). Auch den Miniantikörper-sekretierende NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen (Lyse von 13,7 % \pm 5,2 %) hatten keinen Einfluss auf die Lyse der K562 Zellen durch die PBMCs, was im Einklang mit den Ergebnissen der Kontrolle mit 0,78 nM rekombinantem anti-PDL1-Fc Protein steht. Die Immunzytokin-

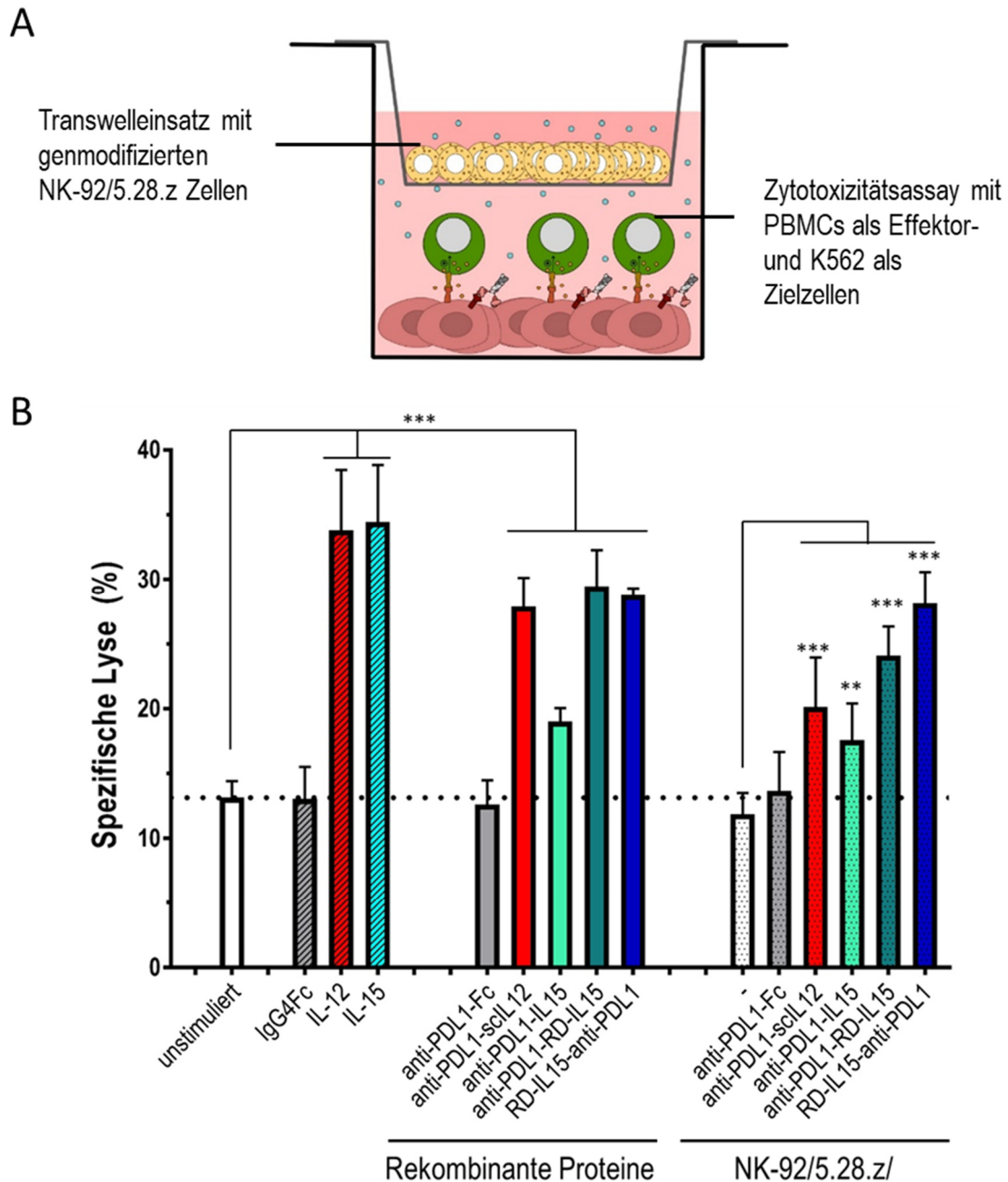


Abbildung 4.27: **Transwell-Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung des Einflusses sekretierter Immunzytokine auf benachbarte Immunzellen.** (A) **Aufbau des Transwell-Zytotoxizitätsassays.** PBMCs gesunder Spender wurden als Effektorzellen für den Zytotoxizitätsassay in einer 24-Well-Platte ausgesät ($2,4 \times 10^6$ Zellen in 1 ml bereits durch CAR NK-92 Zellen konditioniertem Medium). Jeweils 3×10^5 CAR NK-92 Zellen wurden mithilfe eines Transwell-Einsatzes über Nacht mit den PBMCs kokultiviert. Am nächsten Tag wurden jeweils $1,2 \times 10^5$ CV-gefärbte K562 Zellen zu den PBMCs hinzugegeben (*E:T-Ratio* von 20:1) und die Zellen wurden für 2 h kokultiviert. Während des Zytotoxizitätsassays verblieben die Transwell-Einsätze in der 24-Well-Platte. (B) **Stimulation der Zytotoxizität primärer Immunzellen durch Kokultivierung mit genmodifizierten CAR NK-92 Zellen.** Nach 2 h Kokultivierung wurden die Zellen aus der 24-Well-Platte geerntet und mit PI gefärbt. Lysierte K562 Zellen wurden als CV- und PI-positive Zellpopulation im Durchflusszytometer identifiziert. Unstimulierte PBMCs und PBMCs, welche mit NK-92/5.28.z Zellen kokultiviert wurden, dienten als Kontrollen. Zudem wurden PBMCs zum Vergleich in frischem X-VIVO⁺⁺ Medium ausgesät und über Nacht mit 10 ng/ml murinem IL-12 (0,13 nM), humanem IL-15 (0,78 nM) oder den äquimolaren Mengen an aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen stimuliert. Die Spezifische Lyse der K562 Zellen wurde durch Abzug der spontanen Lyse (K562 Zellen ohne Effektorzellen) ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit PBMCs unterschiedlicher Spender nach *block shift*-Korrektur. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

sekretierenden CAR NK-92 Zellen erhöhten dagegen durch die von ihnen sekretierten Faktoren die spezifische Lyse der K562 Zellen durch die kokultivierten PBMCs signifikant. PBMCs, welche mit den anti-PDL1-sclL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen kokultiviert wurden, lysierten durchschnittlich $20,1 \% \pm 6,6 \%$ der K562 Zellen. Der immunstimulatorische Effekt der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen war jedoch signifikant geringer als der von 0,13 nM an rekombinantem anti-PDL1-sclL12. Durch die Kokultivierung mit NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 Zellen (Lyse von $17,6 \% \pm 5,3 \%$) wurde die Zytotoxizität der primären Immunzellen in vergleichbarem Maß erhöht wie durch Zugabe von 0,78 nM rekombinantem anti-PDL1-IL15 Protein. Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen (Lyse von $28,1 \% \pm 2,9 \%$) und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen (Lyse von $28,1 \% \pm 6,3 \%$) stimulierten die Zytotoxizität der PBMCs im Vergleich zu den anderen Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen am effektivsten. Die immunstimulatorische Wirkung der NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen war dabei vergleichbar mit der von 0,78 nM an gereinigtem RD-IL15-anti-PDL1. Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen steigerten die Zytotoxizität der primären Immunzellen hingegen signifikant geringer als das zum Vergleich eingesetzte rekombinante Immunzytokin. Die Ergebnisse der Transwell-Zytotoxizitätsassays zeigen somit, dass die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen die Immunzytokine in ausreichenden Mengen sekretieren, um die Zytotoxizität umgebender Immunzellen zu stimulieren. Der rekombinante anti-PDL1-Fc Miniantikörper hatte wie das von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen sekretierte Protein dagegen keine messbare stimulatorische Wirkung auf die Zytotoxizität der primären Immunzellen. Insofern kann aus den erhaltenen Daten kein Rückschluss auf den Einfluss der anti-PDL1-Domäne als *Immune Checkpoint*-Inhibitor gezogen werden.

In einem zweiten Transwell-Assay wurde die stimulatorische Wirkung der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) untersucht. Hierzu wurden PBMCs von jeweils zwei gesunden Spendern isoliert. Die PBMCs des ersten Spenders wurden mit CFSE gefärbt und als Effektorzellen in die Transwell-Einsätze ausgesät. Als Stimulatorzellen wurden CD3-negative PBMCs eines zweiten Spenders isoliert und mit 25 Gy bestrahlt. Die Stimulatorzellen wurden anschließend in die Transwell-Einsätze zu den Effektorzellen hinzugegeben, so dass Effektor- und Stimulatorzellen in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen. Unveränderte und Immunzytokin-sekretierende NK-92/5.28.z Zellen wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät und die Transwell-Einsätze mit den Effektor- und Stimulatorzellen wurden in die mit CAR NK-Zellen vorbereiteten Vertiefungen der 24-Well-Platte eingesetzt. Anschließend wurden die Ansätze für 7 Tage kultiviert (Abbildung 4.28, A). Um den Einfluss definierter Konzentrationen von Zytokinen auf die PMBCs zu untersuchen, wurden in separaten Ansätzen Effektor- und Stimulatorzellen zusammen mit 10 ng/ml murinem IL-12 (0,13 nM), 10 ng/ml humanem IL-15 (0,78 nM) oder mit den aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen (jeweils 100 nM) in Abwesenheit von NK-92/5.28.z Zellen kultiviert. In der Endpunkt-Analyse der GLR wurden die PBMCs aus den Transwell-Einsätzen geerntet und mit einem APC-gekoppelten Antikörper

spezifisch für CD8 gefärbt. Proliferierende CD8⁺ T Zellen innerhalb der PBMCs wurden anschließend im Durchflusszytometer von ruhenden CD8⁺ T-Zellen durch ein reduziertes CFSE-Signal unterschieden. Als Kontrolle wurden in einem weiteren Ansatz Effektorzellen alleine ohne Stimulatorzellen kultiviert.

Ohne die Stimulation durch die allogenen CD3-negativen Zellen hatten an Tag 7 durchschnittlich 8,9 % \pm 1,6 % der CD8⁺ T-Zellen mindestens eine oder mehrere Zellteilungen durchlaufen (Abbildung 4.28, B). Durch die Kokultivierung mit den Stimulatorzellen stieg der Anteil der CFSE^{low} CD8⁺ T-Zellen auf 42,6 % \pm 9,9 % an. Wie bereits in den zuvor durchgeführten GLRs beobachtet (siehe Abbildung 4.15), steigerte die Stimulation mit den Zytokinen IL-12 (0,13 nM; 55,0 % \pm 10,6 %) und IL-15 (0,78 nM; 92,3 % \pm 0,6 %) oder den gereinigten Antikörperfusionsproteinen anti-PDL1-Fc (100 nM; 77,8 % \pm 5,5 %), anti-PDL1-sclIL12 (100 nM; 76,5 % \pm 5,9 %), anti-PDL1-IL15 (100 nM; 78,0 % \pm 2,3 %), anti-PDL1-RD-IL15 (100 nM; 92,2 % \pm 0,6 %) und RD-IL15-anti-PDL1 (100 nM; 93,5 % \pm 0,2 %) die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen signifikant. Das rekombinante IgG4-Fc Kontrollprotein (100 nM; 49,1 % \pm 10,0 %) hatte dagegen keinen Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellproliferation. CD8⁺ T-Zellen, welche während der Alloreaktion mit den unmodifizierten CAR NK-92/5.28.z Zellen kokultiviert wurden, wiesen eine leicht reduzierte CD8⁺ T-Zellproliferation auf (33,7 % \pm 9,6 %). Diese Abnahme der CD8⁺ T-Zellproliferation war statistisch jedoch nicht signifikant und könnte auf den zusätzlichen Nährstoffverbrauch der CAR NK-92 Zellen zurückgehen. Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc (32,2 % \pm 3,9 %) und NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12 (41,2 % \pm 6,4 %) Zellen waren nicht in der Lage, durch die Sekretion der Antikörperfusionsproteine die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen zu steigern. Dagegen wurden in den Ansätzen mit den kokultivierten NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15 (48,9 % \pm 9,8 %), NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 (81,8 % \pm 2,2 %) und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 (86,1 % \pm 1,0 %) Zellen jeweils erhöhte Anteile an CFSE^{low} CD8⁺ T-Zellen detektiert. Die dadurch induzierte Proliferation der CD8⁺ T-Zellen war jedoch jeweils signifikant geringer als in den Kontrollansätzen mit den aufgereinigten Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1. Diese Ergebnisse der Transwell-GLR zeigen, dass die stimulatorische Wirkung der genmodifizierten CAR NK-92 Zellen auf die Proliferation von benachbarten CD8⁺ T-Zellen durch die Menge der sekretierten Immunzytokine limitiert wird. Während die aufgereinigten Antikörperfusionsproteine in den Kontrollansätzen den Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen jeweils signifikant steigerten, wurden offenbar nur die Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 von den CAR NK-92 Zellen in ausreichenden Mengen sekretiert, um ähnliche immunstimulatorische Effekte zu induzieren.

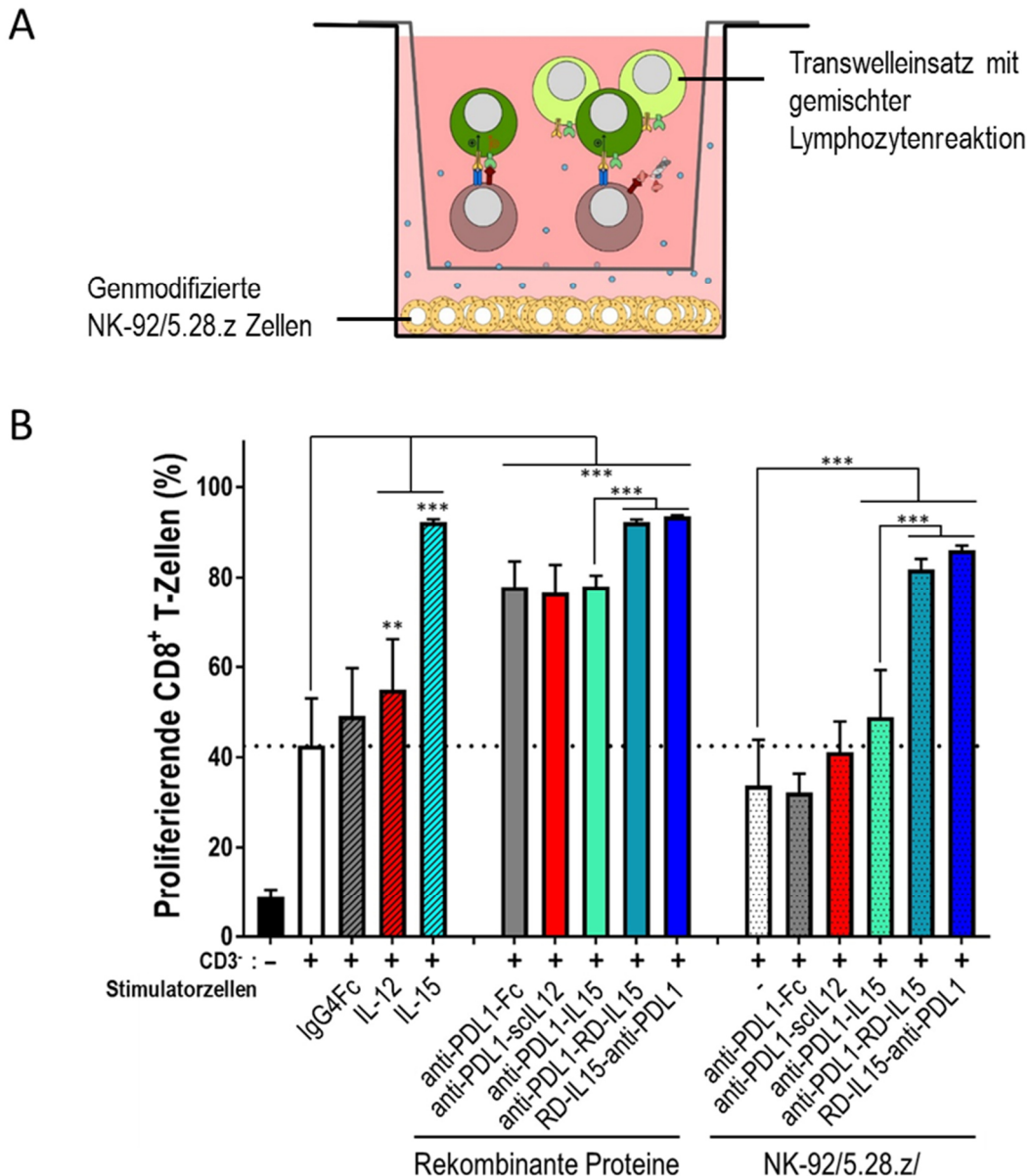


Abbildung 4.28: Transwell-GLR zur Bestimmung des Einflusses sekretierter Immunzytokine auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. **(A)** Schematischer Aufbau der Transwell-GLR. PBMCs gesunder Spender wurden isoliert, mit CFSE gefärbt und als Effektorzellen in einem Transwell-Einsatz ausgesät ($1,5 \times 10^5$ Zellen in insgesamt 300 μ l bereits durch CAR NK-92 Zellen konditioniertem Medium). Als Stimulatorzellen wurden jeweils CD3-negative PBMCs eines zweiten Spenders verwendet. Die Stimulatorzellen wurden mit 25 Gy bestrahlt und in einem Verhältnis von 1:1 zu den Effektorzellen in die Transwell-Einsätze hinzugegeben. Die Transwell-Einsätze wurden in eine 24-Well-Platte eingesetzt, welche zuvor mit jeweils 1 ml konditioniertem Medium mit 3×10^5 CAR NK-92 Zellen pro Well befüllt wurde. Die primären Immunzellen wurden für 7 Tage mit den CAR NK-92 Zellen kokultiviert, wobei an Tag 4 die 24-Well-Platte mit den CAR-NK-92 Zellen ausgetauscht wurde. **(B)** Einfluss der Immunzytokin-Sekretion auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. Nach 7 Tagen wurde die GLR abgestoppt, indem die primären Immunzellen aus den Transwell-Einsätzen geerntet und mit einem CD8spezifischen Antikörper gefärbt wurden. Proliferierende CD8⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch aufgrund des reduzierten CFSE-Signals von den ruhenden T-Zellen unterschieden. Als Kontrollen dienten PBMCs, welche mit unveränderten NK-92/5.28.z Zellen kokultiviert wurden. Zum Vergleich wurden PBMCs in frischem X-VIVO⁺⁺ Medium ausgesät und über Nacht mit 10 ng/ml murinem IL-12 (0,13 nM), humanem IL-15 (0,78 nM) oder mit den aufgereinigten Antikörperperfusionsproteinen (jeweils 100 nM) stimuliert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD nach *block shift*-Korrektur von drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit PBMCs unterschiedlicher Spender. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3.4. Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3

In den Experimenten dargestellt in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 wurde in Immunoblot-Analysen zur Detektion phosphorylierter STAT-Proteine zunächst nachgewiesen, dass die von genmodifizierten CAR NK-Zellen sekretierten Immunzytokine jeweils autokrin auf die Produzentenzellen zurückwirken und diese stimulieren. Durch die autokrine Stimulation mit den IL-15- und IL-15-Superagonist-basierten Immunzytokinen verkürzte sich die durchschnittliche Verdopplungszeit der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen, wodurch sie gegenüber den unveränderten CAR NK-92/5.28.z Zellen einen Wachstumsvorteil erhielten. Die Expression der Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 befähigte die CAR NK-92 Zellen außerdem dazu, über einen längeren Zeitraum auch ohne exogenes IL-2 zu überleben und zu proliferieren. CAR NK-92 Zellen, welche das Immunzytokin anti-PDL1-sclL12 exprimieren, wiesen eine reduzierte natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität auf. Die Expression des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers oder der IL-15-basierten Immunzytokine hatte keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der CAR NK-92 Zellen. In weiteren Zytotoxizitätsassays konnte gezeigt werden, dass die in den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen beobachtete Reduktion der Zytotoxizität auch in unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen durch eine 14-tägige Stimulation mit IL-12 reproduziert werden kann. Dieser negative Effekt von exogenem IL-12 auf die Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen war reversibel und konnte durch den Entzug von IL-12 zum Großteil wieder aufgehoben werden. In den in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Transwell-Assays wurde die mögliche Stimulation umgebender Immunzellen durch die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen untersucht. Hierbei sekretierten die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen die stimulatorischen Immunzytokine in ausreichenden Mengen, um sowohl die Zytotoxizität primärer Immunzellen gegenüber K562 Tumorzellen als auch die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in einer Alloreaktion zu steigern. Auch die anti-PDL1-sclL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen führten während der Kokultivierung mit primären Immunzellen zu einer Steigerung der spezifischen Lyse der K562 Tumorzellen. In Transwell-GLRs zeigten jedoch sowohl die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 als auch die Miniantikörper-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen im Gegensatz zu definierten Konzentrationen an den aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen keine stimulatorische Wirkung auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen.

4.4. Antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen in einem murinen *in vivo*-Tumormodell

Nach der funktionellen Charakterisierung der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen *in vitro*, wurde am Beispiel einer ausgewählten Zellpopulation die mögliche antitumorale Wirkung der Zellen in einem immunkompetenten Mausmodell untersucht. Für diese *in vivo* Studien wurde ein subkutaner Glioblastom-Modell mit ErbB2-exprimierenden murinen GL261/ErbB2 Zellen in syngen C57BL/6 Mäusen gewählt, welches in früheren Arbeiten von Zhang et al. bereits für die Charakterisierung von unveränderten NK-92/5.28.z Zellen eingesetzt worden war (Zhang et al., 2016). Durch die peritumorale Injektion von 1×10^7 NK-92/5.28.z Zellen (Behandlungsbeginn an Tag 7 nach Tumordinjektion, je zwei Injektionen pro Woche für vier Wochen) konnte damals in einem Großteil der Tiere eine Tumorabstoßung ausgelöst werden. Die überlebenden Tiere waren zudem durch die Ausbildung eines immunologischen Langzeitschutzes in nachfolgenden *Rechallenge*-Experimenten gegen das erneute Auswachsen von GL261/ErbB2 Zellen geschützt.

Zunächst wurde in Vorexperimenten die Expression von ErbB2 und PD-L1 auf den murinen GL261 und GL261/ErbB2 Tumorzellen und die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den CAR NK-92 Zellen in *in vitro* Zytotoxizitätsexperimenten untersucht. Sowohl auf der Zelloberfläche der GL261 Zellen als auch auf den stabil transfizierten GL261/ErbB2 Zellen wurde eine deutliche Expression von murinem PD-L1 mittels einer Antikörperfärbung nachgewiesen (Abbildung 4.29, A). Auch die Expression von humanem ErbB2 wurde auf den transfizierten GL261/ErbB2 Zellen bestätigt (Abbildung 4.29, A). In der Literatur ist beschrieben, dass der PD-L1-spezifische Antikörper Atezolizumab sowohl humanes PD-L1 als auch murines PD-L1 kreuzreaktiv bindet (Chatterjee et al., 2016; Irving, 2012). Dies wurde in durchflusszytometrischen Analysen mit GL261/ErbB2 Zellen überprüft. Hierbei wurde sowohl eine Bindung eines PD-L1-spezifischen Antikörpers, abgeleitet von Atezolizumab, als auch eine Bindung des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers an die Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.29, B).

Die Sensitivität der GL261 und GL261/ErbB2 Zellen gegenüber den Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen wurde in einem zweistündigen Zytotoxizitätsassay untersucht. Bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 lysierten die ErbB2-spezifischen CAR NK-92/5.28.z Zellen durchschnittlich $9,4 \% \pm 2,2 \%$ der GL261 Zellen (Abbildung 4.29, C). Die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen wiesen jeweils eine vergleichbare Zytotoxizität auf. Die GL261/ErbB2 Zellen waren wie erwartet aufgrund der Expression des CAR-Antigens sensitiver gegenüber der Lyse durch die CAR NK-92/5.28.z Zellen. So wurden bei einer *E:T-Ratio* von 10:1 durchschnittlich $60,5 \% \pm 10,1 \%$ der GL261/ErbB2 Zellen abgetötet. Die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen lysierten die GL261/ErbB2

Ergebnisse

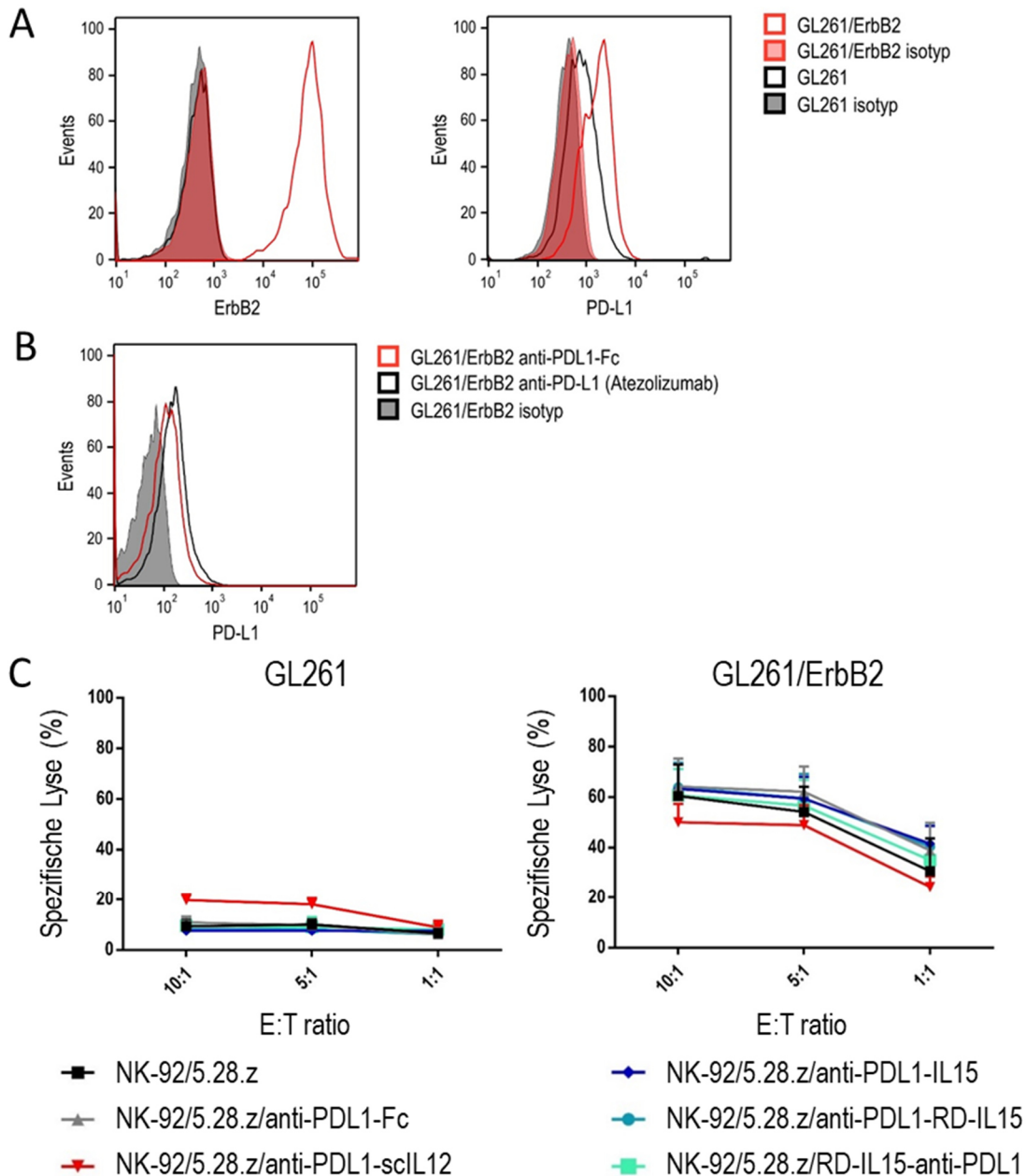


Abbildung 4.29: **(A) Expression von ErbB2 und PD-L1 auf den murinen Glioblastomzellen GL261 und GL261/ErbB2.** Jeweils 1×10^6 GL261 (schwarze Linie) und GL261/ErbB2 (rote Linie) Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper spezifisch für humanes ErbB2 oder mit einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für murines PD-L1 gefärbt. Als Negativkontrollen dienten GL261 und GL261/ErbB2 Zellen, welche mit einem Fluorochrom gekoppelten, irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps gefärbt wurden (graue beziehungsweise rote Fläche). **(B) Bindung von murinem PD-L1 durch den Atezolizumab-basierten anti-PDL1-Fc Miniantikörper.** Jeweils 1×10^6 GL261/ErbB2 Zellen wurden mit einem PD-L1-spezifischen Antikörper, abgeleitet von Atezolizumab, oder mit dem rekombinanten anti-PDL1-Fc Miniantikörper gefärbt. Auf den Zellen gebundene Antikörper-Moleküle wurden mit einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für humanes IgG-Fc detektiert. Als Negativkontrolle dienten GL261/ErbB2 Zellen, welche nur mit dem Sekundärintikörper gefärbt wurden. **(C) Sensitivität der murinen Glioblastomzelllinien GL261 und GL261/ErbB2 gegenüber den genmodifizierten CAR NK-92 Zellen.** Jeweils 2×10^4 Calcein Violet-gefärbte Tumorzellen wurden mit CAR NK-92 Zellen in verschiedenen E:T-Ratios für 2 h kokultiviert. Abgetötete Tumorzellen wurden mittels einer PI-Färbung detektiert. Die spezifische Lyse wurde durch Abzug der spontanen Lyse (Zielzellen, welche ohne Effektorzellen mitgeführt wurden) berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Zellen in einem vergleichbaren Ausmaß. Für die weitere Untersuchung *in vivo* wurden NK-92/5.58.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen ausgewählt. Diese hatten in den vorausgegangenen Transwell-Zytotoxizitätsassays und in den Transwell-GLRs, neben den NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen, welche ein ähnliches Protein sekretieren, die größten immunstimulatorischen Effekte auf umgebende Immunzellen gezeigt.

Für das subkutane Glioblastom-Modell wurden jeweils 1×10^6 GL261/ErbB2 Zellen in die rechte Flanke von weiblichen, sechs Wochen alten C57BL/6 Mäusen injiziert. Im Gegensatz zu den Studien von Zhang et al. wurde die Tumorbehandlung erst an Tag 22 nach Tumorinokulation begonnen, um die möglichen Effekte der CAR NK-92 Zellen gegen größere Tumoren, mit bereits etablierter Tumormikroumgebung zu untersuchen (Abbildung 4.30). Die Mäuse wurden anhand des Tumolvolumens bei Therapiebeginn gleichermaßen den Behandlungsgruppen zugeordnet. Zur Behandlung wurden zweimal je Woche für vier Wochen jeweils 1×10^7 NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen, 1×10^7 NK-92/5.28.z Zellen oder 100 μ l zellfreies Injektionsmedium peritumoral injiziert. Während des laufenden Tierversuchs wurde das Körpergewicht der Mäuse in regelmäßigen Zeitintervallen gemessen und das Tumolvolumen mithilfe einer Schieblehre bestimmt. Mäuse, deren Tumor einen Durchmesser von 1,5 cm erreichte, die einen Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Körpergewichts oder sonstige gesundheitliche Auffälligkeiten aufwiesen, wurden aus dem Experiment genommen und euthanisiert.

Die mittlere Überlebensdauer (Median) der Mäuse betrug in der Kontroll-Behandlungsgruppe (X-VIVO⁺⁺) 104 Tage nach Tumorinokulation (Abbildung 4.31, A). Durch die Behandlung mit den

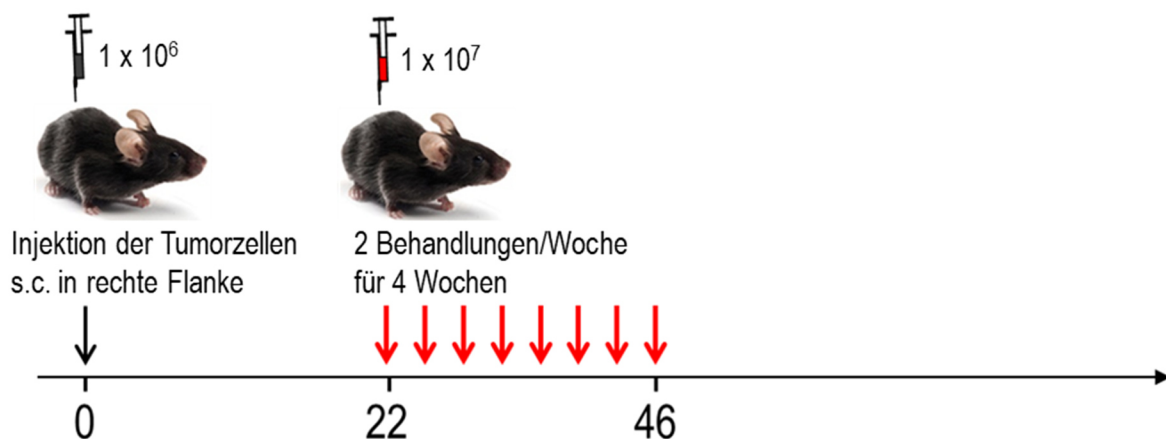


Abbildung 4.30: Schematische Darstellung des subkutanen Glioblastom-Modells mit Behandlungsstrategie. An Tag 0 wurden jeweils 1×10^6 GL261/ErbB2 Zellen subkutan in die rechte Flanke von weiblichen C57BL/6 Mäusen injiziert. Für die Behandlung der Tumoren wurden ab Tag 22 jeweils zweimal pro Woche für vier Wochen 1×10^7 NK-92/5.28.z oder NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen peritumoral injiziert. Als Negativkontrolle wurden Mäuse mit zellfreiem Injektionsmedium (X-VIVO⁺⁺) behandelt. Die Tumolvolumina wurden in regelmäßigen Zeitabständen mithilfe einer Schieblehre bestimmt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation euthanisiert, sobald der Tumordurchmesser eine Größe von 1,5 cm erreichte, eine Gewichtabnahme von mehr als 20 % Körpergewicht oder sonstige Gesundheits- oder Verhaltensauffälligkeiten beobachtet wurden.

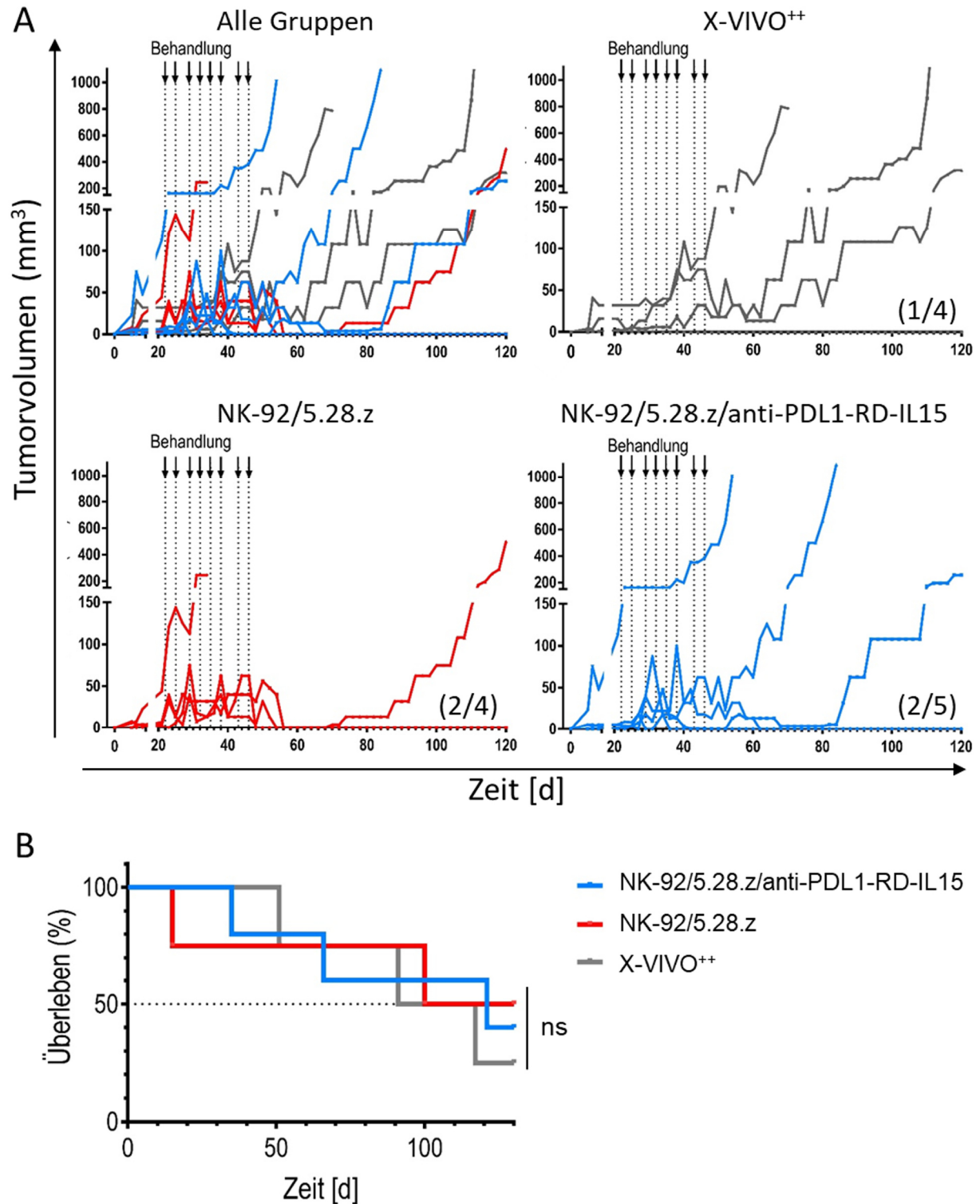


Abbildung 4.31: **Behandlung subkutaner GL261/ErbB2 Tumoren mit NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen.** **(A) Kinetik des Tumorwachstums.** Die Tumorzellen wurden in regelmäßigen Zeitabständen mithilfe einer Schieblehre bestimmt. **(B) Symptomfreies Überleben.** Gezeigt ist das symptomfreie Überleben der behandelten C57BL/6 Mäuse, dargestellt als Kaplan-Meier Kurve. Die Mäuse wurden unter Narkose durch zervikale Dislokation euthanisiert, sobald der Tumordurchmesser 1,5 cm erreichte, eine Gewichtsabnahme von mehr als 20 % Körpergewicht oder sonstige Gesundheits- oder Verhaltensauffälligkeiten auftraten. Pro Gruppe wurden jeweils vier bis fünf Tiere behandelt. Unterschiede innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen im symptomfreien Überleben wurden mithilfe des Log-Rank-Test statistisch evaluiert. ns: nicht signifikant.

NK-92/5.28.z Zellen wurde die mittlere Überlebensdauer auf 115 Tage verlängert. Die mit den Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen behandelten Versuchstiere wiesen mit 121 Tagen die längste mittlere Überlebensdauer auf. Dabei induzierte die Behandlung mit den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen in 2 der insgesamt 5 Mäuse dieser Gruppe die Abstoßung des Tumors. Auch die unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen lösten in 2 von insgesamt 4 Tieren dieser Gruppe die Tumorabstoßung aus, wodurch diese Tiere bis zum Ende des Experiments an Tag 122 tumorfrei blieben. In der Kontroll-Behandlungsgruppe überlebte eine der insgesamt vier C57BL/6 Mäuse dieser Gruppe nach spontaner Abstoßung des Tumors. Die ermittelten Unterschiede in der Überlebensrate und der mittleren Überlebensdauer zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Bei Betrachtung des Tumorzumens über die Zeit fiel auf, dass die Tiere mit den größten Tumorzumina zu Behandlungsbeginn unabhängig von der später angewandten Therapie jeweils als erste euthanisiert werden mussten (Abbildung 4.31, A). Die Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen oder Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen induzierte im Gegensatz zur Kontrolltherapie (zellfreies Injektionsmedium) während des Behandlungszeitraums nach Injektion eine temporäre Abnahme des Tumorzumens. Nach Beendigung der Behandlung wuchsen in Tieren, welche die Tumoren nicht komplett abgestoßen hatten, die Tumoren jedoch wieder aus. In der Kontroll-Behandlungsgruppe nahm das Tumorzumens unabhängig von der Behandlung kontinuierlich zu.

Zusammenfassung des Abschnitts 4.5

In den Experimenten dargestellt in Abschnitt 4.5 wurde die antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-Zellen am Beispiel von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 in einem immunkompetenten Glioblastom-Modell mit GL261/ErbB2 Zellen untersucht. Zuvor wurde *in vitro* die Expression von humanem ErbB2 sowie die Bindung des Atezolizumab-abgeleiteten anti-PDL1-Fc Miniantikörpers an murines PD-L1 auf den GL261/ErbB2 Zellen durchflusszytometrisch bestätigt. Nach peritumoraler Therapie etablierter subkutaner GL261/ErbB2 Tumoren, zeigte sich kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil der mit NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen behandelten Tiere im Vergleich zu Mäusen, die mit unveränderten NK-92/5.28.z Zellen behandelt wurden. Die Therapie mit NK-92/5.28.z Zellen oder NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen verzögerte im Vergleich zur Kontrollgruppe während der Behandlungsphase das weitere Wachstum größer, bereits etablierter GL261/ErbB2 Tumoren. Trotz des bereits fortgeschrittenen Tumorzumens zu Behandlungsbeginn induzierte sowohl die Behandlung mit NK-92/5.28.z als auch mit NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen in jeweils 2 Tieren der Gruppen eine vollständige Tumorabstoßung.

5. Diskussion

Aufgrund der hohen erzielten Ansprechraten in klinischen Studien gegen rezidierte/refraktäre B-Zell-Leukämien und -Lymphome wurden bereits zwei CD19-spezifische CAR T-Zellprodukte (Kymriah von Novartis und Yescarta von Gilead) von der FDA und EMA zugelassen (Maude et al., 2018; Neelapu et al., 2017). CAR-Therapien gegen solide Tumoren zeigten trotz vielversprechender präklinischer Daten bisher hingegen nur eine geringe therapeutische Wirksamkeit in Patienten (Ahmed et al., 2015; O'Rourke et al., 2017). Faktoren, welche die Sensitivität der Tumoren gegenüber CAR-Therapien beeinflussen, sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass neben der heterogenen Antigenexpression auf den Tumorzellen die Ausbildung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung, zum Beispiel durch T_{Reg}-Zellen, Tumor-assoziierte Makrophagen und auch myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) die Wirksamkeit von CAR-Therapien bei soliden Tumoren limitiert (Martinez und Moon, 2019; O'Rourke et al., 2017). Zudem sind Tumorzellen dazu in der Lage, durch die Expression von Liganden sogenannter immunregulatorischer *Immune Checkpoint*-Rezeptoren wie PD-1, TIM-3 oder LAG-3 Immunzellen zu hemmen und der Immunüberwachung zu entgehen. Neben endogenen Immunzellen, weisen auch adoptiv transferierte CAR-Effektorzellen kurze Zeit nach der Injektion in den Patienten eine erhöhte Expression von verschiedenen Erschöpfungsmarkern wie PD-1 auf (Brudno et al., 2016; Kochenderfer et al., 2015; O'Rourke et al., 2017). In präklinischen Studien wurde zudem gezeigt, dass *Immune Checkpoint*-Inhibitoren die Zytotoxizität und Proliferationskapazität von CAR-Effektorzellen signifikant steigern können. Auch *in vivo* führte die Injektion von PD-1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren zu einer effektiveren Kontrolle des Tumorwachstum durch CAR T-Zellen, sowie zu einer Reduktion der immunregulatorischen MDSCs innerhalb des Tumormikromilieus (Cherkassky et al., 2016; John et al., 2013). Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass auch Krebs-Patienten von einer Kombinationstherapie bestehend aus CAR-Effektorzellen und *Immune Checkpoint*-Inhibitoren profitieren könnten.

Tatsächlich wurden bereits CAR-Effektorzellen zusammen mit einer PD-1/PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Blockade in präklinischen und klinischen Studien untersucht (Martinez und Moon, 2019). Ein Ansatz war hierbei der *knock-down* beziehungsweise *knock-out* von PD-1 in den CAR-Effektorzellen, durch gentechnische Methoden wie zum Beispiel shRNAs (engl. *short hairpin ribonucleic acid*) oder mittels der CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas9 (engl. *CRISPR associated protein 9*)-Technologie (Wei et al., 2019). CD19-spezifische CAR T-Zellen wiesen nach der gezielten Ausschaltung des PD-1-Gens durch CRISPR/Cas9 *in vitro* eine gesteigerte Zytotoxizität auf und konnten in einem Nalm6-Leukämiemodell die B-Zellblasten schneller und effektiver eliminieren

(Ren et al., 2017; Rupp et al., 2017). Ungeachtet der positiven präklinischen Daten sollte bei dem *knock-out* von PD-1 aber bedacht werden, dass der Einsatz von CRISPR/Cas9-modifizierten CAR-Zellen in Patienten durch das Risiko von *off-target*-Mutationen eingeschränkt wird. Außerdem profitieren nur die adoptiv transferierten CAR-Effektorzellen selbst von der genetischen Modifikation. Endogene Immunzellen, welche die Antitumorreaktion der CAR-Effektorzellen unterstützen könnten, werden weiterhin durch die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen inhibiert. Aktuelle klinische Studien zu Kombinationstherapien umfassen die gleichzeitige Behandlung mit CD19/CD22-spezifischen CAR T-Zellen und PD-L1/PD-1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren (Atezolizumab, Durvalumab und Pembrolizumab). In der ZUMA-6-Studie wurde nach der intravenösen Injektion von Atezolizumab jeweils ein Anstieg der CAR T-Zellen und des IFN γ -Levels im Blut der Patienten detektiert (Jacobson et al., 2018). Eine Steigerung in der Frequenz oder der Stärke der induzierten Nebenwirkungen wurde durch die Kombinationstherapie nicht festgestellt.

Ein Nachteil bei der Behandlung mit CAR-Effektorzellen und den *Immune Checkpoint*-Inhibitoren besteht wie bei anderen Antikörper-basierten Immuntherapien darin, dass die *Immune Checkpoint*-Inhibitoren den Patienten in regelmäßigen Abständen verabreicht werden müssen und aufgrund der geringen Diffusion in Geweben womöglich nur in unzureichenden Mengen an den Tumor gelangen. CAR-Zellen, welche den *Immune Checkpoint*-Inhibitor ektopisch exprimieren und direkt innerhalb des Tumormikromilieus sekretieren, stellen daher einen interessanten Lösungsansatz für das Problem der geringen Serumhalbwertszeit und der Gewebegängigkeit der *Immune Checkpoint*-Inhibitoren dar. Die überlegene antitumorale Wirkung von *Immune Checkpoint*-Inhibitor-sekretierenden CAR T-Zellen gegenüber bisherigen CAR-Zellen konnte bereits in verschiedenen präklinischen Studien gezeigt werden. CAIX-spezifische CAR T-Zellen waren zum Beispiel durch die Sekretion eines antagonistischen, PD-L1-spezifischen Antikörpers dazu in der Lage, in einem orthotopen Nierenzell-Karzinommodell eine größere Anzahl an endogenen NK-Zellen zu rekrutieren und auch die Expression von Erschöpfungsmarkern auf CAR T-Zellen und TILs zu reduzieren (Suarez et al., 2016). In einem subkutanen Xenograftmodell wurde durch die Behandlung mit scFv(PD-1)-sekretierenden CD19-spezifischen CAR T-Zellen tatsächlich in mehr Tieren die Tumorabstoßung induziert als bei der Kombination von CD19-spezifischen CAR T-Zellen mit einer wiederholten intraperitonealen Injektion des PD-1-Antagonisten (Li et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen CAR-Zellprodukts, basierend auf ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen und PD-L1-spezifischen Immunzytokinen, die als *Immune Checkpoint*-Inhibitor wirken und darüber hinaus durch die enthaltenen proinflammatorischen Zytokine in der Tumorumgebung vorliegende Immunzellen zu einer Antitumorreaktion stimulieren.

5.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanten PD-L1-spezifischen Immunzytokinen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden unterschiedliche PD-L1-spezifische Immunzytokine rekombinant in stabil transfizierten HEK293 Zellen hergestellt und in funktionalen Assays auf ihre immunstimulatorische Wirkung untersucht, bevor sie im zweiten Teil der Arbeit zur Ableitung von ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen eingesetzt verwendet wurden, die diese Proteine direkt sezernieren.

Die hier generierten Immunzytokine enthalten jeweils das gleiche PD-L1-spezifische scFv-Antikörperfragment, welches von dem *Immune Checkpoint*-Inhibitor Atezolizumab abgeleitet wurde. Atezolizumab (Tecentriq®, Genentech/Roche) ist seit September 2017 in der Europäischen Union zur Behandlung von fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungen- (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) und Blasenkarzinomen zugelassen (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecentriq>, Stand 2019). Innerhalb des scFv-Fragments sind die variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperketten, V_H und V_L , mit einem GS-Linker verbunden. Über einen weiteren Linker ist je nach Antikörperfusionsprotein eine unterschiedliche Zytokindomäne an den scFv-Antikörper gekoppelt. Das Immunzytokin anti-PDL1-sclL12 enthält ein murines IL-12-Molekül im Einzelkettenformat (sclL-12), welches über eine modifizierte, von IgG abgeleitete *hinge*-Region an den C-Terminus des scFv-Fragments gekoppelt wurde. Innerhalb von sclL-12 sind die beiden Proteinuntereinheiten von IL-12 (p40 und p35) über einen weiteren GS-Linker verbunden. Die p40-Untereinheit wurde aufgrund beschriebener Expressionsvorteile dieses Aufbaus N-Terminal von p35 angeordnet (Lieschke et al., 1997). Durch die Expression von anti-PDL1-sclL12 als einkettiges Protein wird die korrekte Proteinfaltung des Immunzytokins vereinfacht und die Bildung von p40-Homodimeren verhindert, welche als Antagonist die Wirkung von IL-12 hemmen (Gillesen et al., 1995; Lieschke et al., 1997; Ling et al., 1995; Mattner et al., 1993). Das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 enthält ein humanes IL-15-Molekül, welches über eine von IgG abgeleitete, modifizierte *hinge*-Region an den C-Terminus des scFv-Fragments fusioniert ist. Zwei weitere Immunzytokine, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1, enthalten jeweils einen rekombinanten IL-15-Superagonisten als Zytokindomäne. Der IL-15-Superagonist besteht aus zwei Proteinfragmenten, der Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptors α (Aminosäuren 31-107, IL15R α_{31-107}) und einer humanen IL-15-Mutante (IL-15_{N72D}), welche über einen GS-Linker miteinander fusioniert wurden. Durch die beiden Modifikationen weist der IL-15-Superagonist im Vergleich zu IL-15 eine erhöhte Affinität zu dem *intermediate-affinity* IL-15-Rezeptor auf, während die Bindung zum *high-affinity* IL-15-Rezeptor nicht beeinflusst wird (Mortier et al., 2006; Zhu et al., 2009). Innerhalb des Immunzytokins anti-PDL1-RD-IL15 ist die Sushi-Domäne des IL-15-

Superagonisten über einen GS-*Linker* mit dem C-Terminus der Antikörperdomäne verbunden. In dem Fusionsprotein RD-IL15-anti-PDL1 befindet sich der IL-15-Superagonist dagegen am N-Terminus des scFv-Fragments. Aufgrund der unterschiedlichen Anordnung der Zytokin- und Antikörperdomänen können anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 potenziell sowohl biochemische als auch funktionale Unterschiede aufweisen. Als Kontrollprotein wurde ein PD-L1-spezifischer Miniantikörper generiert, in welchem das scFv-Antikörperfragment über eine von IgG abgeleitete *hinge*-Region an die konstanten Domänen C_H2 und C_H3 einer schweren IgG4-Antikörperkette gekoppelt ist. Das verkürzte Format des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers vereint die Vorteile eines scFv-Fragments mit denen eines IgG-Antikörpers. So kann der Miniantikörper als zunächst einkettiges Protein einfacher produziert werden, weist aber nach Homodimerisierung dennoch eine bivalente Antigenbindung und die Fc-vermittelten Funktionen eines IgG-Antikörpers auf. Durch den Fc-Teil können Miniantikörper, ähnlich wie IgG-Antikörper, vom neonatalen Fc-Rezeptor "recycelt" werden, wodurch sie eine signifikant längere Serum-Halbwertszeit als scFv-Antikörper aufweisen (Schirrmann und Bussow, 2010). Für die Herstellung des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers wurde eine IgG4 Fc-Domäne gewählt, welche im Gegensatz zu anderen IgG-Subklassen kaum ADCC oder CDC auslöst. Da PD-L1 kein tumorspezifisches Antigen ist, sondern auch auf Immunzellen und anderen normalen Körperzellen exprimiert wird, wird das Risiko von auftretenden *on-target/off-tumor*-Toxizitäten durch die Wahl eines IgG4 Fc-Teil reduziert (Davies und Sutton, 2015). Um die Sekretion der Antikörperfusionsproteine zu gewährleisten wurde jeweils an den N-Terminus ein Signalpeptid, abgeleitet von einer schweren IgG Antikörperkette, angefügt. Die Immunzytokine enthalten zudem am C-Terminus einen HA- und His₆-*Tag*, um die Identifikation und Aufreinigung mittels IMAC zu ermöglichen.

Die verschiedenen Antikörperfusionsproteine wurden mithilfe des eukaryotischen Expressionsplasmids pcDNA3 in die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293 eingebracht, wo sie unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurden. Nach Antibiotika-Selektion wurden stabil transfizierte HEK293 Zellpools für die anschließende Proteinproduktion in serumfreiem Opti-MEM Medium mit dem Selektions-Antibiotikum G418 kultiviert. Die sekretierten Antikörperfusionsproteine konnten dabei jeweils in ausreichenden Mengen produziert und aus den Zellkulturüberständen mittels IMAC oder Protein-G-Affinitätschromatographie isoliert werden (Tabelle 4.1.1).

5.1.1. Biochemische Charakterisierung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine

In Immunoblot-Analysen wurde durch Detektion der einzelnen Antikörper- und Zytokindomänen die Identität und Integrität der verschiedenen Antikörperfusionsproteine belegt (Abbildung 4.4). Mithilfe eines Atezolizumab-spezifischen Antikörpers konnten alle generierten Antikörperfusionsproteine in den Eluatfraktionen nachgewiesen werden. Während der Miniantikörper zusätzlich durch einen Antikörper spezifisch für humanes IgG detektiert werden konnte, wurde das Immunzytokin anti-PDL1-sclL12 in den Eluatfraktionen durch einen IL-12 (p40/p70)-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Mithilfe eines IL-15-spezifischen Antikörpers wurden die IL-15-basierten Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 detektiert. Zudem wurden die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1, über die enthaltene Sushi-Domäne des IL-15-Superagonisten, mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch für IL-15R α nachgewiesen. In den Immunoblot-Analysen wurden in den Eluatfraktionen der Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-IL15 zusätzliche Proteinbanden mit geringerer molekularer Masse detektiert, welche auf mögliche Abbauprodukte der Fusionsproteine hinweisen. Diese könnten durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt mittels Größenausschluss-Chromatographie entfernt werden. In den durchgeführten Immunoblot-Analysen fiel zudem auf, dass die molekularen Massen der eluierten Antikörperfusionsproteine nicht mit den theoretisch berechneten Werten übereinstimmten. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Molekülmassen stellt die in eukaryotischen Zellen stattfindende posttranslationale Modifikation von Proteinen durch das Anhängen von N- und O-Glykosylresten dar.

Die im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat stattfindende Glykosylierung ist ein wichtiger Schritt bei der Expression von sekretierten eukaryotischen Proteinen, welcher auch die Funktionalität von rekombinanten Proteinen beeinflusst. So weisen zum Beispiel in *E. coli* hergestellte, unglykosylierte Zytokine oftmals eine verminderte Aktivität und Proteinstabilität auf als dieselben in eukaryotischen Zellen produzierten Zytokine (Cebon et al., 1990; Li et al., 2014). Auch das Ausmaß der Sekretion von eukaryotischen Proteinen kann, wie an dem Beispiel von IL-15 gezeigt, durch die Proteinglykosylierung beeinflusst werden (Duitman et al., 2008). Die Stärke der Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen kann bei der Entwicklung von rekombinanten Antikörpern durch die Entfernung einer einzelnen N-Glykosylierungsstelle innerhalb der Fc-Domäne, welche die Bindung an Fc-Rezeptoren vermittelt, modifiziert werden (Jennewein und Alter, 2017).

Mithilfe der *Online* Bioinformatik Tools "NetNGlyc 1.0" und "NetOGlyc 4.0" wurden die generierten Antikörperfusionsproteine auf potenzielle N- und O-Glykosylierungsstellen untersucht. Die in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine wiesen jeweils mindestens vier, im Fall von anti-PDL1-sclL12

sogar bis zu 25 mögliche N- und O-Glykosylierungsstellen auf (Tabelle 4.1.1). Um zu untersuchen, ob die Antikörperfusionsproteine Glykosylierungen aufweisen und die kovalent gebundenen Glykosylgruppen die beobachteten Unterschiede in den molekularen Massen verursachen, wurden die gereinigten Fusionsproteine mithilfe des Enzyms PNGase F verdaut. Die Amidase PNGase F spaltet glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylglucosamin und Asparagin, wodurch der Großteil aller N-Glykosylierungen entfernt werden kann. Anschließend wurden die Antikörperfusionsproteine jeweils im verdauten und unverdauten Zustand in einem Immunoblot durch eine Atezolizumab-spezifische Antikörper-Färbung untersucht (Abbildung 4.5). Nach dem enzymatischen Verdau wiesen die Antikörperfusionsproteine jeweils eine geringere molekulare Masse auf. Diese Ergebnisse belegen, dass N-Glykosylierungen auf den isolierten Proteinen vorhanden waren. Die molekularen Massen der Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 stimmten nach dem Verdau ungefähr mit den berechneten kDa-Werten überein. Nur das Immunzytokin anti-PDL1-sclL12 wies, vermutlich aufgrund von verbleibenden O-Glykosylgruppen, auch nach dem Verdau mit PNGase F noch eine erhöhte molekulare Masse auf. Um eine vollständige Deglykosylierung der Fusionsproteine zu erreichen, könnten neben PNGase F noch weitere Enzyme wie O-Glykosidase, β 1-4 Galaktosidase S, α 2-3,6,8,9 Neuraminidase A und β -N-Acetylhexosaminidase für den Verdau eingesetzt werden. Die Immunzytokine anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-RD-IL15, welche bei vorherigen Immunoblot-Analysen jeweils als Proteindoppelbanden detektiert wurden, lagen nach dem Verdau mit PNGase F als einzelne Proteinbanden vor. Dieses Ergebnis zeigt, dass anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-RD-IL15 in nativer Form verschiedene Glykosylierungsmustern aufweisen.

Die in anti-PDL1-Fc enthaltene *hinge*-Region vermittelt über zwei Disulfidbrücken die Homodimerisierung des Miniantikörpers. Die Immunzytokine anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-sclL12 enthalten jeweils eine modifizierte, von IgG1 abgeleitete *hinge*-Region, welche durch Deletion der enthaltenen Cystein-Reste die Homodimerisierung der Immunzytokine verhindert (EP 1 418 184 A1, A. Hombach, 08.11.2002). Innerhalb der Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 sind der IL-15-Superagonist und die Antikörperdomäne über einen GS-Linker verbunden.

Um zu untersuchen, ob die Antikörperfusionsproteine jeweils als Monomer vorliegen oder auch Dimere bilden, wurden die generierten Antikörperfusionsproteine in einem SDS-Polyacrylamidgel jeweils unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden anschließend mittels Coomassie-Färbung detektiert oder in Immunoblot-Analysen untersucht (Abbildung 4.6). Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper bildete unter nicht-reduzierenden Bedingungen wie erwartet Homodimere aus, welche als etwa 130 kDa Proteinbande in Immunoblot-Analysen mit einem anti-human IgG Antikörper detektiert werden konnten. In den Eluaten der Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-IL15 waren trotz modifizierter *hinge*-Region ebenfalls Proteinbanden mit höherer molekularen Masse detektierbar, welche auf gebildete

Dimere oder Proteinaggregate zurückzuführen sind. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1, welche anstatt der von IgG abgeleiteten *hing*-Region einen zweiten *GS-Linker* enthalten, wurden sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen ausschließlich als reine Monomere nachgewiesen. Obwohl die Dimerisierung der Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-IL15 so nicht beabsichtigt war, stellt die Bildung von Homodimeren zunächst keinen Nachteil für die Antikörperfusionsproteine dar. Solange die Antikörper- und Zytokindomänen in den gebildeten Homodimeren nicht sterisch behindert werden, könnten die Immunzytokine auch von einer Homodimerisierung profitieren. So könnten die Immunzytokin-Homodimere bedingt durch die bivalente Bindung eine höhere Bindungsaffinität für PD-L1 aufweisen, wodurch ihre Wirkung als *Immune Checkpoint*-Inhibitoren gesteigert werden könnte. Durch die größere molekulare Masse würden Homodimere zudem auch nicht so schnell ausgeschieden und hätten so eine erhöhte Serumhalbwertszeit. Teil der nachfolgenden Analysen war es, die Funktionalität der in den Immunzytokinen enthaltenen Zytokin- und Antikörperdomänen zu untersuchen und mögliche Einflüsse der Homodimerisierung der Antikörperfusionsproteine einzuschätzen.

5.1.2. Antigenbindung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine

Zunächst wurde die Bindung des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers an humanes PD-L1 in einem Immunpräzipitations-Experiment untersucht. Hierfür wurden Protein-G-gekoppelte, magnetische Dynabeads mit dem isolierten Miniantikörper beladen und anschließend über Nacht mit Proteinlysaten der PD-L1-positiven Zelllinie A431 inkubiert. In nachfolgenden Immunoblot-Analysen konnte durch die Färbung mit einem PD-L1-spezifischen Antikörper belegt werden, dass der Miniantikörper humanes PD-L1 aus den Lysaten der A431 Zellen gebunden und präzipitiert hatte (Abbildung 4.7).

Die Bindung der Immunzytokine an humanes PD-L1 wurde in einem Sandwich-ELISA mit rekombinantem PD-L1-Fc Protein untersucht. An PD-L1-Fc gebundene Antikörperfusionsproteine wurden dabei durch einen Biotin-gekoppelten, anti-idiotypischen Antikörper gerichtet gegen Atezolizumab und anschließende Färbung mit Streptavidin-HRP detektiert. Die Immunzytokine und der zum Vergleich eingesetzte anti-PDL1-Fc Miniantikörper banden jeweils konzentrationsabhängig an rekombinantes PD-L1-Fc Protein. Mithilfe der Software GraphPad Prism 7.02 wurden anschließend die Sättigungskurven für die Antikörperfusionsproteine bestimmt und die Dissoziationskonstanten (K_d) annähernd ermittelt (Tabelle 4.1.3). Die Dissoziationskonstante beschreibt bei einer Gleichgewichtsreaktion die Konzentration, bei der die Hälfte der Bindungsstellen abgesättigt vorliegt, und ist somit ein Maß für die Bindungsaffinität zwischen den Antikörperfusionsproteinen und PD-L1-

Fc. Der berechnete K_d-Wert für den anti-PDL1-Fc Miniantikörper betrug in etwa 0,81 nM. Das zum Teil als Dimer vorliegende Immunzytokin anti-PDL1-IL15 wies mit einem K_d-Wert von 0,68 nM eine vergleichbare Bindungsaffinität wie der bivalente Miniantikörper auf. Das Immunzytokin anti-PDL1-sclL12, welches ebenfalls zum Teil Dimere ausbildete wies mit einem K_d-Wert von etwa 1,51 nM hingegen eine weniger starke Bindung an PD-L1-Fc auf. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 (1,75 nM) und RD-IL15-anti-PDL1 (1,2 nM) banden trotz des ähnlichen Proteindesigns mit geringfügig unterschiedlicher Affinität an PD-L1-Fc. Die Ergebnisse des Sandwich-ELISA deuten darauf hin, dass die Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-RD-IL15 womöglich aufgrund sterischer Probleme im Vergleich zu den anderen Antikörperfusionsproteinen eine geringere Bindungsaffinität für PD-L1-Fc aufweisen. Allerdings sollte bedacht werden, dass die K_d-Werte mithilfe des durchgeführten Sandwich-ELISA nur annäherungsweise bestimmt werden konnten. Die Bindungsaffinität eines rekombinanten Antikörpers wird durch viele Faktoren wie zum Beispiel den Aufbau und die Anzahl der enthaltenen Antigenbindungsstellen oder auch der Flexibilität und Länge des Proteinlinkers bestimmt. Ein weiterer Faktor, welcher die Bindungsaffinität-Messung maßgeblich beeinflusst, ist der Anteil an falsch gefalteten Molekülen und unvollständigen Proteinfragmenten. Um die Bindungsaffinität genauer bestimmen zu können, müssten zunächst nicht funktionale Antikörperfragmente aus den Eluaten zum Beispiel mittels Größenausschluss-Chromatographie entfernt werden. Anschließend könnte die Bindungsaffinität der so aufgereinigten Antikörperfusionsproteinen mithilfe einer Quarzkristall-Mikrowaage oder zum Beispiel durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie analysiert werden.

Nachdem die spezifische Bindung der Antikörperfusionsproteine an rekombinantes humanes PD-L1-Protein bestätigt werden konnte, wurde in durchflusszytometrischen Analysen die Bindung der Antikörperfusionsproteine an PD-L1-exprimierende Tumorzelllinien untersucht. Hierzu wurden PD-L1-positive A431 und PD-L1-negative K562 Zellen mit den gleichen molaren Mengen an Antikörperfusionsproteinen gefärbt (Abbildung 4.9). Eine Bindung der Antikörperfusionsproteine konnte dabei jeweils an die PD-L1-exprimierenden A431 Zellen aber nicht an die PD-L1-negativen K562 Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die generierten Antikörperfusionsproteine auch auf der Zelloberfläche exprimiertes PD-L1 spezifisch binden können.

5.1.3. Analysen zur Zytokinaktivität der PD-L1-spezifischen Immunzytokine

Nach dem Bindungsnachweis an PD-L1 wurde die Funktionalität der in den Antikörperfusionsproteinen enthaltenen proinflammatorischen Zytokindomänen untersucht. Um die Zytokinaktivität von anti-PDL1-sclIL12 zu belegen, wurden NK-92/5.28.z Zellen mit murinem IL-12, anti-PDL1-sclIL12 oder anti-PDL1-Fc stimuliert. Die Proteinlysate der NK-92/5.28.z Zellen wurden anschließend in Immunoblot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für γ -Tubulin, STAT4 und pSTAT4 (pY693) gefärbt. Dabei diente pSTAT4 als Produkt des durch IL-12-induzierten JAK/STAT-Signalweges als indirekter Nachweis für die Aktivierung des IL-12-Rezeptorkomplexes (Bacon et al., 1995). Während unstimulierte oder mit dem anti-PDL1-Fc Miniantikörper stimulierte NK-92/5.28.z Zellen kein phosphoryliertes STAT4 aufwiesen, konnte in den Lysaten der mit IL-12 oder anti-PDL1-sclIL12 stimulierten NK-92/5.28.z Zellen eine pSTAT4-spezifische Proteinbande detektiert werden (Abbildung 4.10). Diese Ergebnisse belegen, dass die Zytokindomäne des Immunzytokins anti-PDL1-sclIL12 funktional ist und durch Bindung des IL-12-Rezeptorkomplexes die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4 induziert.

Um die Funktionalität der in den Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 enthaltenen IL-15- und IL-15-Superagonist-Domänen zu untersuchen, wurden NK-92/5.28.z Zellen zunächst für 24 h ohne IL-2 kultiviert, bevor sie anschließend mit rekombinantem IL-15, anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 oder RD-IL15-anti-PDL1 stimuliert wurden. In nachfolgenden Immunoblot-Analysen wurden die Proteinlysate der NK-92/5.28.z Zellen mit Antikörpern spezifisch für STAT5, pSTAT5 (pY694) und γ -Tubulin gefärbt. Phosphoryliertes STAT5, ein Produkt der durch IL-2 und IL-15 induzierten JAK/STAT-Signalwege, diente hier als indirekter Nachweis der Aktivierung des IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexes (Johnston et al., 1995). NK-92/5.28.z Zellen, welche über Nacht weiterhin mit IL-2 kultiviert wurden, wiesen wie erwartet eine pSTAT5-spezifische Proteinbande auf. Durch den Entzug von IL-2 wurde die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors fast komplett abgebaut, konnte jedoch durch die Stimulation mit IL-15 oder den rekombinanten Immunzytokinen anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 wieder rekonstituiert werden. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper beeinflusste die Phosphorylierung von STAT5 hingegen nicht. Diese Ergebnisse belegen, dass die Zytokindomänen der Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 funktional sind und durch Bindung des IL-15-Rezeptorkomplexes den JAK/STAT-Signalweg in NK-92/5.28.z Zellen induzieren.

In Arbeiten von Zhu et al. wurde in ähnlichen Experimenten mit IL-15 $\alpha\beta\gamma$ -exprimierenden TF-1 Zellen gezeigt, dass 10 pM IL-15_{N72D} die Phosphorylierung von STAT5 effektiver induziert als die gleiche molare Konzentration an rekombinantem IL-15 (Zhu et al., 2009). Ein ähnlicher Aktivitätsunterschied zwischen dem IL-15-enthaltenden Antikörperfusionsprotein anti-PDL1-IL15 und den IL-15-Superagonist-

enthaltenden Immunzytokinen anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 konnte in den hier durchgeführten Immunoblot-Analysen nicht beobachtet werden. Vermutlich lagen die Immunzytokine mit den hier eingesetzten Konzentrationen (0,39 nM) bereits nahe der Sättigung vor, wodurch eventuell bestehende Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Immunzytokinen ausgeglichen wurden.

5.1.4. Immunstimulatorische Wirkung der PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine

Nachdem sowohl die Zytokinaktivität als auch die Bindung an humanes PD-L1 für die Antikörperfusionsproteine bestätigt werden konnte, wurde in weiteren funktionellen Analysen die immunstimulatorische Wirkung der Immunzytokine auf primäre Immunzellen untersucht.

Im Vorfeld wurde hierfür die PD-1- und PD-L1-Expression auf den mononukleären Zellen des peripheren Bluts durchflusszytometrisch bestimmt. Aus den Vollblutproben drei verschiedener, gesunder Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs isoliert und für 48 h jeweils in X-VIVO⁺⁺ mit oder ohne PHA-L kultiviert. PHA-L ist ein Lektin der roten Kidneybohne (*Phaseolus vulgaris*) und dazu in der Lage, durch die Bindung an Oberflächen-Glykoproteine Lymphozyten unspezifisch zu aktivieren (Movafagh et al., 2011). Nach 2 Tagen wurden die primären Zellen mit Antikörpern spezifisch für CD3, CD56 und PD-L1 oder PD-1 gefärbt. In durchflusszytometrischen Analysen konnten somit die CD3⁺CD56⁻ T-Zellen, CD3⁻CD56⁺ NK-Zellen, CD3⁺CD56⁺ NKT-Zellen und die CD3⁻CD56⁻ Immunzellen unterschieden und separat auf die Expression von PD-1 und PD-L1 untersucht werden.

Die PBMCs der untersuchten Spender wiesen bereits im unstimulierten Zustand PD-L1 auf ihrer Zelloberfläche auf (Abbildung 4.12). Durch die Stimulation mit PHA-L wurde die PD-L1-Expression auf den verschiedenen Immunzellpopulationen weiter gesteigert. Der *Immune Checkpoint*-Rezeptor PD-1 wurde auf den unstimulierten CD3-positiven T- und NKT-Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.13). Die CD3-negativen Immunzellen waren hingegen zum Großteil PD-1-negativ. Nur bei einem einzelnen Spender wiesen auch die CD3-negativen Immunzellen eine geringe PD-1-Expression auf. Durch die anhaltende Stimulation mit PHA-L wurde die Expression von PD-1 auf den T- und den NKT-Zellen gesteigert und konnte auch auf den CD3-negativen Immunzellpopulationen induziert werden.

Diese Daten zur PD-L1- und PD-1-Expression auf primären Immunzellen des peripheren Bluts bestätigten frühere Angaben in der Literatur. PD-L1 wird auf vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen bereits konstitutiv exprimiert und kann durch Stimulation mit

proinflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2 und IL-15 zusätzlich induziert werden (Francisco et al., 2010; Kinter et al., 2008). Hier wurden die PBMCs vor der durchflusszytometrischen Analyse für 48 h in X-VIVO⁺⁺ in Anwesenheit von IL-2 kultiviert. Dies erklärt die mittels Durchflusszytometrie detektierte basale PD-L1-Expression auf den Immunzellen.

Der *Immune Checkpoint*-Rezeptor PD-1 wird laut Literatur auf CD3-positiven T- und NKT-Zellen, aber auch auf vielen anderen Immunzellen wie zum Beispiel B-Zellen, NK-Zellen, DCs und Monozyten aktivierungsbedingt exprimiert. Auf CD4^+ und CD8^+ T-Zellen wird die Expression von PD-1 durch die Aktivierung des T-Zellrezeptors oder auch durch Stimulation mit Zytokinen der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten-Familie, wie IL-2 und IL-15, induziert (Francisco et al., 2010; Kinter et al., 2008). Die Kultivierung mit IL-2-enthaltendem X-VIVO⁺⁺ erklärt somit auch die gemessene Expression von PD-1 auf den unstimulierten CD3^+ T- und NKT-Zellen. Die Beobachtung von Benson et al., dass die Stimulation mit 150 IU/ml IL-2 für 48 h auch in NK-Zellen die Expression von PD-1 induziert, konnte hier nur bei einem Spender reproduziert werden (Benson et al., 2010). Pesce und Kollegen konnten eine kleine Subpopulation von PD-1-positiven CD56^{dim} NK-Zellen charakterisieren, welche allerdings nur in etwa 25 % der untersuchten gesunden Spender zu finden war und mit früher aufgetretenen HCMV-Infektionen in Verbindung gebracht wurde (Pesce et al., 2019). PHA-L induziert die Expression von PD-L1 und PD-1 vermutlich durch verschiedene Mechanismen. Zum einen führt die Bindung der Oberflächen-Glykoproteine wie *Toll-like*-Rezeptoren oder auch T-Zellrezeptoren zur Aktivierungsbedingten Expression von PD-1 und PD-L1. Die daraufhin resultierende Sekretion von $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und weiteren proinflammatorischen Zytokinen durch die aktivierten Lymphozyten führt anschließend zur weiteren Stimulation der PD-1- und PD-L1-Expression.

Immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf die Zytotoxizität primärer Lymphozyten

Die immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine wurde zunächst in einem Zytotoxizitätsassay untersucht. Als Effektorzellen wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und über Nacht mit rekombinantem IL-12, IL-15 oder den äquimolaren Konzentrationen an Immunzytokinen stimuliert. Als Zielzelllinie wurde die PD-L1-negative Erythroleukämie-Zelllinie K562 eingesetzt. K562 Zellen werden aufgrund der fehlenden Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen insbesondere von NK-Zellen aber nicht von CD8^+ zytotoxischen T-Zellen lysiert (Gong et al., 1994; Lozzio und Lozzio, 1975). Die Angaben in der Literatur bezüglich der Sensitivität von K562 Tumorzellen gegenüber NKT-Zellen sind widersprüchlich. Zumeist wurde nur eine geringe Zytotoxizität der NKT-Zellen gegenüber K562 Zellen nachgewiesen oder die Zytotoxizität wurde nur einer kleinen

Subpopulation der NKT-Zellen zugeordnet (Kawano et al., 1999; Kitayama et al., 2016; Kuylensstierna et al., 2011; Nicol et al., 2000). Da die PD-1-positiven NKT-Zellen insgesamt nur einen sehr geringen Anteil im peripheren Blut einnehmen (0,01 % - 1,18 % der Lymphozyten), kann der Einfluss der NKT-Zellpopulation in den hier angesetzten Zytotoxizitätsassays vermutlich vernachlässigt werden (Bernin et al., 2016). Nach der Stimulation mit den Antikörperfusionsproteinen wurden die PBMCs mehrmals mit frischem Medium gewaschen, bevor sie in verschiedenen *E:T-Ratios* mit CV-gefärbten K562 Tumorzellen für 2 h kokultiviert wurden. Lysierte K562 Zellen wurden anschließend durch Färbung mit PI durchflusszytometrisch detektiert (Abbildung 4.14).

Die hier als Zielzellen eingesetzten K562 Tumorzellen weisen keine PD-L1-Expression auf, was grundsätzlich Auswirkungen auf den Effekt der Immunzytokine auf die Aktivität der PBMCs haben könnte. Tatsächlich ist die PD-L1-Expression des Tumors jedoch kein verlässlicher Indikator dafür, ob durch die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* eine Immunreaktion gegen den Tumor ausgelöst wird oder nicht. In klinischen Studien wurde mehrfach festgestellt, dass auch Patienten mit PD-L1-negativen Tumoren von der Behandlung mit PD-1/PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren profitieren (Powles et al., 2014). Inzwischen wurde in mehreren präklinischen Studien gezeigt, dass die PD-L1-Expression auf dem umgebenden, gesunden Gewebe und auf den tumorinfiltrierenden Immunzellen ebenfalls ausreichend ist, um die Antitumorreaktion zu inhibieren (Kleinovink et al., 2017; Noguchi et al., 2017). So könnte die PD-L1-Expression auf den hier eingesetzten PBMCs ebenfalls ausreichen, um die Zytotoxizität der primären Lymphozyten zu hemmen.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Hemmung der primären Lymphozyten durch umgebende PD-L1-exprimierende PBMCs. Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper zeigte keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der Effektorzellen. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der zuvor gezeigten geringen PD-1-Expression insbesondere auf den für die Aktivität gegen K562 wichtigen primären NK-Zellen. Auch nach Stimulation mit PHA-L für 48 h wurde zuvor auf CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen nur in geringen Mengen PD-1 detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Vorstimulation mit den Immunzytokinen über Nacht und auch die zweistündige Stimulation während des Zytotoxizitätsassays nicht ausreichend war, um die Expression von PD-1 auf den NK-Zellen zu induzieren. Benson und Kollegen kultivierten primäre NK-Zellen gesunder Spender für 72 h mit IL-2 (150 IU/ml), um die Expression von PD-1 zu induzieren. In anschließenden Zytotoxizitätsassays lysierten die vorstimulierten NK-Zellen PD-L1-exprimierende Myelomzellen nach Zugabe eines PD-1-spezifischen antagonistischen Antikörpers effektiver (Benson et al., 2010). Eine längere Vorstimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder mit anderen PD-1-induzierenden Reagenzien wäre ein möglicher Ansatz für zukünftige Experimente, um die Effekte der PD-L1-Blockade insbesondere auf primäre NK-Zellen untersuchen zu können. Einen weiteren möglichen Lösungsansatz stellt der Einsatz von murinen NK-Zellen aus tumortragenden Mäusen dar.

Hsu et al. zeigten in verschiedenen murinen Tumormodellen, dass die Anzahl der PD-1-positiven NK-Zellen nach Tumorinokulation signifikant ansteigt. Durch Injektion eines PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitors wurde das Tumorwachstum abhängig von den NK-Zellen besser kontrolliert (Hsu et al., 2018).

Die Immunzytokine anti-PDL1-sclIL12, anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1, mit enthaltenen proinflammatorischen Zytokindomänen, steigerten im Gegensatz zum Miniantikörper die Lyse der K562 Tumorzellen durch die PBMCs. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 erhöhten die Lyse der K562 Zellen dabei jeweils effektiver als das Immunzytokin anti-PDL1-IL15. Dieser Aktivitätsunterschied kann auf die höhere Bindungsaffinität des IL-15-Superagonisten im Vergleich zu IL-15 zurückgeführt werden (Mortier et al., 2006; Zhu et al., 2009). In der Literatur werden den proinflammatorischen Zytokinen IL-12 und IL-15 sowohl zytotoxizitätssteigernde als auch proliferationsinduzierende Effekte auf primäre NK- und CD8⁺ T-Zellen zugeschrieben (Jakobisiak et al., 2011; Tugues et al., 2015). Xu und Kollegen zeigten in einem immunkompetenten Myelommodell, dass der IL-15-Superagonist ALT-803 *in vivo* eine signifikante Steigerung der NK- und T-Zellzahlen induziert (Xu et al., 2013). Das IL-12-basierte Immunzytokin NHS-IL12 war ebenfalls in der Lage, *in vivo* die Proliferation von NK- und CD8⁺ T-Zellen wie auch die Reifung von DCs zu induzieren (Fallon et al., 2014). Obwohl die PBMCs hier nach der Stimulation mit den Antikörperfusionsproteinen erneut gezählt wurden, könnte ein ähnlicher proliferativer Effekt der PD-L1-spezifischen Immunzytokine den Anteil an NK-Zellen in den PBMCs erhöht haben, wodurch die *E:T-Ratios* zugunsten der Effektorzellen verändert worden wären. In zukünftigen Experimenten könnte die mögliche proliferationsinduzierende Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf primäre NK-Zellen technisch einfach durch Bestimmung des Anteils CD56-positiver Zellen untersucht werden.

Immunstimulatorische Wirkung der Antikörperfusionsproteine auf CD8⁺ T-Zellen

In einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR), wurden die immunstimulatorischen Effekte der Antikörperfusionsproteine auf CD8⁺ T-Zellen untersucht. Für die GLR wurden jeweils PBMCs von zwei gesunden Spendern isoliert. Die PBMCs des ersten Spenders wurden mit CFSE gefärbt, während vom zweiten Spender die CD3-negativen PBMCs isoliert und mit 25 Gy bestrahlt wurden. Die CFSE-gefärbten Effektorzellen wurden anschließend mit den CD3-negativen Stimulatorzellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und für 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Antikörperfusionsproteinen kokultiviert. Erkennen die CD8⁺ T-Zellen während der Kokultivierung den fremden MHC-Komplex der CD3-negativen Stimulatorzellen, werden die T-Zellen aktiviert und

beginnen zu proliferieren. Gleichzeitig kann die Expression von PD-L1 auf den CD3-negativen Stimulatorzellen und auf den umgebenden PBMCs die TCR-vermittelte Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen hemmen. Üben die Antikörperfusionsproteine während der stattfindenden Alloreaktion einen immunstimulatorischen Effekt auf die CD8⁺ T-Zellen aus, erhöht dies die Proliferationsrate der T-Zellen. Nach 7 Tagen wurden die Immunzellen mit einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die proliferierenden CD8⁺ T-Zellen wurden durch ein reduziertes CFSE-Signal identifiziert. Der Anteil an proliferierenden APC⁺ CFSE^{low} T-Zellen wurde als Maß für den immunstimulatorischen Effekt der Antikörperfusionsproteine interpretiert (Abbildung 4.15).

Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper war dazu in der Lage, den Anteil an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in den angesetzten Alloreaktionen signifikant zu erhöhen. Dies weist die Funktion der PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperdomäne als *Immune Checkpoint*-Inhibitor nach. Der immunstimulatorische Effekt des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers war dabei konzentrationsabhängig. Ab einer Antikörperkonzentration von 50 nM erreichte der Anteil an CFSE^{low} CD8⁺ T-Zellen jedoch ein Plateau, welches mit einer Absättigung der PD-L1-Bindestellen auf den PBMCs erklärt werden kann. Die Immunzytokine anti-PDL1-sclIL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 induzierten die CD8⁺ T-Zellproliferation jeweils effektiver als der anti-PDL1-Fc Miniantikörper. Nur das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 stimulierte trotz der zusätzlichen IL-15-Domäne die CD8⁺ T-Zellproliferation nicht signifikant stärker als der anti-PDL1-Fc Miniantikörper. Obwohl anti-PDL1-IL15 bereits im Zytotoxizitätsassay eine geringere immunstimulatorische Wirkung aufwies als die IL-15-Superagonist-enthaltenden Immunzytokine, war das Ergebnis der GLR dennoch überraschend. Erwartet worden wäre ein proliferationsinduzierender Effekt von anti-PDL1-IL15, welcher in der Höhe zwischen dem Effekt des Miniantikörpers und den Effekten der anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 Immunzytokine liegt. Die geringe Wirkung von anti-PDL1-IL15 könnte eventuell auf eine niedrige Stabilität der Zytokindomäne zurückgeführt werden. Bergamaschi et al. zeigten in ELISA-Messungen, dass IL-15 bedingt durch Degradierungsprozesse eine Halbwertszeit von nur ungefähr 70 Minuten aufweist. Durch die Komplexbildung mit der Sushi-Domäne des IL-15R α konnte die Stabilität von IL-15 jedoch erhöht werden, wodurch das Zytokin auch nach 80 Minuten noch in unveränderter Konzentration detektiert wurde (Bergamaschi et al., 2008). Da die hier durchgeführten GLRs 7 Tage verlaufen, könnte eine mangelnde Stabilität der Zytokindomäne tatsächlich die Wirkung des Immunzytokins anti-PDL1-IL15 hauptsächlich auf die Blockade von PD-L1 beschränken.

Ein synergistischer Effekt durch die Blockade des PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoints* und die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokindomänen konnte in den durchgeführten GLRs leider nicht nachgewiesen werden, da die Immunzytokine anti-PDL1-sclIL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 jeweils vergleichbare Effekte auf die CD8⁺ T-Zellproliferation hatten wie die Zytokinkontrollen.

Möglicherweise induzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-15 in den eingesetzten Konzentrationen bereits die maximale Proliferation der CD8⁺ T-Zellen, wodurch zusätzliche Effekte der PD-L1-Blockade bei der Stimulation mit den Immunzytokinen überlagert werden. Die Beobachtung, dass die Immunzytokine anti-PDL1-scIL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 unabhängig von der eingesetzten Konzentration die CD8⁺ T-Zellproliferation jeweils im gleichen Maß auslösten, unterstützt diese Hypothese.

Die antitumorale Wirkung von Zytokintherapien mit IL-12- oder IL-15 basiert auf der Aktivierung und Induktion der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und IL-15 stimulieren allerdings auch die Expression des immunregulatorischen Liganden PD-L1 auf Tumorzellen, welcher wiederum NK- und CD8⁺ T-Zellen inhibieren kann. Zusätzlich wird durch die Stimulation mit IL-12 und IL-15 auch die Expression von PD-1 auf Lymphozyten gesteigert, wodurch diese sensibler gegenüber der Hemmung durch PD-L1 werden (Austin et al., 2014; Francisco et al., 2010; Kinter et al., 2008). Allein aufgrund dieser Datenlage kann argumentiert werden, dass die Kombination mit PD-1/PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren sinnvoll ist, um die antitumorale Wirkung von IL-15 und IL-12 zu erhöhen. Tatsächlich konnte in mehreren präklinischen Studien die synergistische/additive Wirkung von IL-12 oder IL-15 und einer PD-1/PD-L1-*Immune Checkpoint*-Blockade nachgewiesen werden. Das Immunzytokin NHS-muIL12 kontrollierte zum Beispiel durch die Kombination mit PD-1- oder PD-L1-spezifischen antagonistischen Antikörpern in verschiedenen Tumormodellen das Tumorstadium jeweils effektiver und induzierte ein längeres Überleben als eine NHS-muIL12 Monotherapie (Fallon et al., 2017; Xu et al., 2017). Auch humanes IL-15 und der IL-15-Superagonist ALT-803 profitierten von der Kombination mit einer *Immune Checkpoint*-Blockade. Zusammen mit PD-1/PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren induzierten die Zytokine eine gesteigerte NK- und CD8⁺ T-Zellproliferation, die IL-10-Konzentration im Serum wurde gesenkt und die Anzahl an regulatorischen T-Zellen reduziert (Knudson et al., 2019; Yu et al., 2010). Der IL-15-Superagonist ALT-803 und der PD-1-spezifische *Immune Checkpoint*-Inhibitor Nivolumab werden aktuell in einer klinischen Phase I-Studie beim metastasierenden nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom als Kombinationstherapie untersucht. Dabei zeigte sich bisher in den Patienten ein unbedenkliches Sicherheitsprofil (Wrangle et al., 2018). N-809, ein Fusionsprotein bestehend aus zwei antagonistischen PD-L1-spezifischen scFv-Antikörperfragmenten und dem IL-15-Superagonisten ALT-803, war in der Lage, durch die Bindung an PD-L1 am Tumor zu akkumulieren und in einem subkutanen Tumormodell die Abstoßung des Tumors zu induzieren (Jochims et al., 2019). Ausgehend von diesen Daten erscheint es wahrscheinlich, dass auch die hier generierten Immunzytokine eine gesteigerte antitumorale Wirkung durch synergistische/additive Effekte aufweisen, die funktionellen Assays aber noch weiter optimiert werden müssen, um dies eindeutig nachzuweisen.

In weiterführenden Experimenten könnte zum Beispiel getestet werden, ob die Reduktion der

eingesetzten Immunzytokin-Konzentrationen bereits ausreichend ist, um eine synergistische/additive Wirkung der Zytokin- und scFv-Antikörperdomänen sichtbar zu machen. Eine weitere Möglichkeit wäre die gleichzeitige Stimulation mit rekombinantem IL-2R β -Protein, welches nach unpublizierten Daten von R&D Systems als IL-15-Antagonist wirkt, ohne gleichzeitig IL-2 zu hemmen (<https://www.rndsystems.com/resources/articles/interleukin-15-il-15>, Stand 2019). So könnte die stimulatorische Wirkung der Zytokindomänen verringert werden, ohne anti-PDL1 zu beeinflussen. Um die Zytokinaktivität des Immunzytokins anti-PDL1-scIL12 zu hemmen, könnten rekombinante IL-12 p40-Homodimere als Antagonist zu den Ansätzen gegeben werden (Gillessen et al., 1995; Mattner et al., 1993).

Zusätzlich könnte die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen neben den hier durchgeführten GLRs noch in weiteren Assays untersucht werden. Mithilfe von T-Zellen mit bekannter Antigen-spezifität, zum Beispiel TCR-modifizierten T-Zellen, wäre es möglich, die stimulatorische Wirkung der Immunzytokine auch in Zytotoxizitätsassays zu untersuchen. Eine Alternative zu TCR-modifizierten T-Zellen stellen transgene Mausstämme wie OT-1 oder F5 dar, welche durch das Einbringen von TCR-codierenden DNA-Sequenzen ebenfalls eine Quelle für Antigen-spezifische T-Zellen darstellen (Gillessen et al., 1995; Mattner et al., 1993).

5.2. Expression PD-L1-spezifischer Immunzytokine in ErbB2-spezifischen CAR NK-92/5.28.z Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die ErbB2-spezifische CAR NK-92/5.28.z Zelllinie genetisch modifiziert, um direkt die ektopische Expression und Sekretion der zuvor in rekombinanter Form charakterisierten Antikörperfusionsproteine zu ermöglichen. Vor der Transduktion mit den Immunzytokin-codierenden lentiviralen Vektoren wurde zunächst in durchflusszytometrischen Analysen die Expression von PD-1 und PD-L1 auf den NK-92/5.28.z Zellen untersucht. Im unstimulierten Zustand wiesen die NK-92/5.28.z Zellen weder PD-L1 noch PD-1 auf ihrer Zelloberfläche auf. Erst nach Stimulation mit PMA und Ionomycin über 48 h konnte die Expression von PD-L1 in geringen Mengen, aber nicht die Expression von PD-1 induziert werden (Abbildung 4.16). PMA ist als kleines organisches Molekül in der Lage, die Zellmembran zu passieren und innerhalb des Zytoplasmas die im Signalweg der T-Zellrezeptoraktivierung involvierte Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren. Ionomycin wirkt hingegen als Calcium Ionophor und leitet durch Entlassung von Calcium-Ionen in das Zytoplasma die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT ein, welcher ebenfalls im Signalweg der T-Zellrezeptoraktivierung beteiligt ist. In NK-Zellen werden durch Stimulation mit PMA und Ionomycin entsprechende Signalwege aktiviert. Zusammen induzieren PMA und Ionomycin somit die Produktion von Zytokinen und Interferonen, sowie die Verschmelzung von zytotoxischen Granula mit der Plasmamembran, wodurch die natürliche Aktivierung von T- und NK-Zellen imitiert wird (Castagna et al., 1982; Chatila et al., 1989).

In bereits veröffentlichten Studien sind widersprüchliche Daten zu der PD-1- und PD-L1-Expression auf NK-92 Zellen zu finden. Während Jochems und Kollegen auf einer modifizierten, CD16-exprimierenden NK-92 Zelllinie (haNK) eine relativ hohe Expression von PD-L1 und PD-1 detektierten, wiesen in den Studien von Hsu et al. und Bi et al. wildtypische NK-92 Zellen nur sehr geringe Mengen an PD-L1 aber kein PD-1 auf ihrer Zelloberfläche auf (Bi et al., 2016; Hsu et al., 2018; Jochems et al., 2016). Oelsner und Kollegen detektierten auf CAR NK-92 Zellen PD-1 erst nach wiederholter Stimulation mit CAR-Antigen-exprimierender Tumorzellen (Oelsner et al., 2017). Durch das Einbringen des Epstein-Barr-Virus Proteins LMP1 (engl. *Latent Membrane Protein 1*) konnten Bi et al. die Expression von PD-L1 auf NK-92 Zellen signifikant steigern (Bi et al., 2016). Zusammenfassend kann aus den publizierten Daten und den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Expression von PD-L1 und PD-1 auf NK-92 nicht nur von den Kultivierungsbedingungen, sondern auch durch das Einbringen von Transgenen in die Zelle beeinflusst werden kann. Da zudem mehrfach nachgewiesen wurde, dass auch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen die Expression von PD-L1 und PD-1 auf Lymphozyten induziert, wäre

es sinnvoll, in zukünftigen durchflusszytometrischen Analysen die PD-1- und PD-L1-Expression nach Transduktion der CAR NK-92 Zellen noch einmal zu bestimmen (Austin et al., 2014; Francisco et al., 2010; Kinter et al., 2008).

Für den Gentransfer der Immunzytokin-codierenden DNA-Sequenzen wurde ein lentivirales Drei-Plasmid-System gewählt, welches im Gegensatz zu retroviralen Systemen den Vorteil aufweist, sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen transduzieren zu können (Sakuma et al., 2012; Vigna und Naldini, 2000; Zufferey et al., 1997). Die codierenden DNA-Sequenzen der Immunzytokine wurden hierfür in den lentiviralen, HIV-1 (engl. *human immunodeficiency virus type 1*)-abgeleiteten Transfervektor pSIRW eingebracht. In dem Transfervektor werden die Antikörperfusionsproteine und das Markergen iRFP jeweils unter der Kontrolle des SFFV Promotors konstitutiv exprimiert (Demaion et al., 2002). Anschließend wurden HEK293T Zellen mit den jeweiligen Immunzytokin-codierenden Transfervektoren und den Helferplasmiden (pCMV_ΔR8.91 und pMD2.G) transfiziert, um VSV-G pseudotypisierte, lentivirale Vektorpartikel zu produzieren. Die Zellkulturüberstände mit den enthaltenen Vektorpartikeln wurden genutzt, um die NK-92/5.28.z Zellen zu transduzieren. Trotz Verwendung des als Transduktions-*Enhancer* wirksamen Multi-Kinase-Inhibitors BX795, konnten nach Transduktion nur etwa 0,5 % bis 2,6 % iRFP-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden (Abbildung 4.18) (Sutlu et al., 2012). Die geringen erzielten Transduktionseffizienzen waren aufgrund der relativen Größe der Transferplasmide jedoch nicht ganz unerwartet. Zudem weisen NK-Zellen, bedingt durch ihre Funktion im Immunsystem, eine hohe natürliche Resistenz gegenüber viralen Infektionen auf, wodurch auch die Transduktion mit viralen Partikeln erschwert wird (Brandstadter und Yang, 2011; Lam und Lanier, 2017). Nach der Transduktion wurden die iRFP-positiven, erfolgreich transduzierten NK-92/5.28.z Zellen daher mittels FACS-Zellsortierens zunächst angereichert und dann als genmodifizierte Zellpools (NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1) wieder in Kultur genommen.

5.2.1. Sekretion der PD-L1-spezifischen Immunzytokine durch CAR NK-92 Zellen

Die Sekretion der Antikörperfusionsproteine durch die transduzierten CAR NK-92 Zellen wurde zunächst qualitativ untersucht. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände der iRFP-sortierten NK-92/5.28.z Zellpools gesammelt und enthaltene Fusionsproteine mittels Immunpräzipitation isoliert. Für die Präzipitation der Immunzytokine wurden Protein-G-gekoppelte Dynabeads verwendet, welche zuvor mit 5 µg rekombinantem PD-L1-Fc Protein beladen wurden. Die isolierten Proteine

wurden mit Lämmli-Puffer eluiert und anschließend unter reduzierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. In Immunoblot-Analysen wurden die Immunzytokine durch Färbung mit einem His₆-Tag-spezifischen Antikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch für murines IgG nachgewiesen (Abbildung 4.19, B). In den Zellkulturüberständen der transduzierten iRFP-sortierten NK-92/5.28.z Zellpools konnte jeweils eine Proteinbande mit einer molekularen Masse entsprechend dem zu detektierenden Immunzytokin nachgewiesen werden. Durch diese Ergebnisse konnte die Sekretion der Immunzytokine durch die transduzierten und iRFP-sortierten CAR NK-92 Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Vergleichende Aussagen über den Umfang der Immunzytokin-Sekretion waren jedoch nicht möglich, da für die Analysen nicht die gleichen Zellzahlen ausgesät wurden.

Der anti-PDL1-Fc Miniantikörper wurde direkt mit Protein-G-gekoppelten Dynabeads, welche spezifisch IgG-Fc binden, aus den Zellkulturüberständen der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen präzipitiert. In anschließenden Immunoblot-Analysen wurde der anti-PDL1-Fc Miniantikörper in den Präzipitaten durch einen HRP-gekoppelten Antikörper spezifisch für humanes IgG-Fc detektiert (Abbildung 4.19, A). Sowohl in den Zellkulturüberständen der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen als auch in den Überständen der unmodifizierten NK-92/5.28.z Ausgangszellen wurden dabei zwei Proteinbanden mit molekularen Massen von etwa 55 kDa und 25 kDa detektiert. Diese Proteinbanden können auf die leichte und schwere Antikörperkette von IgG Antikörpern zurückgeführt werden, die durch die Zugabe von humanem Plasma in X-VIVO⁺⁺ enthalten sind und ebenfalls durch die Protein-G-gekoppelten Dynabeads gebunden werden. Da der anti-PDL1-Fc Miniantikörper mit 50,7 kDa eine ähnliche molekulare Masse aufweist wie die schwere IgG-Antikörperkette, konnte der Miniantikörper nicht als eine separate Proteinbande im Präzipitat der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen detektiert werden. Durch die Überlagerung der beiden Proteine war die 55 kDa Proteinbande aus dem Zellkulturüberstand der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen im Immunoblot jedoch deutlich stärker angefärbt als in der Negativkontrolle. Entsprechend bestätigt dieses Ergebnis die Expression und Sekretion des Miniantikörpers durch NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen.

Um die Sekretion der Fusionsproteine durch die transduzierten CAR NK-92/5.28.z Zellen zu quantifizieren, wurden jeweils 10⁶ Zellen der Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z Zellpools in 1 ml X-VIVO⁺⁺ Medium ausgesät und für 72 h kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen. Als Positivkontrolle wurden Antikörperfusionsprotein-exprimierende HEK293 Zellen ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mit einem Sandwich-ELISA die sekretierten, PD-L1-spezifischen Antikörperfusionsproteine detektiert. Für die Quantifizierung wurden aufgereinigte, rekombinante Antikörperfusionsproteine (Kapitel 4.1.1) in einer Standardreihe mit bekannter Konzentration eingesetzt.

Die Immunzytokine anti-PDL1-sclL12, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1, sowie der

Miniantikörper anti-PDL1-Fc wurden jeweils in vergleichbaren Mengen (zwischen 8,5 und 9,5 nM; 464 und 862 ng/ml) in den Zellkulturüberständen der transduzierten NK-92/5.28.z nachgewiesen. Nur das Immunzytokin anti-PDL1-IL15 wurde in deutlich geringeren Mengen (0,4 nM; 16,6 ng/ml) von den CAR NK-92 Zellen in den extrazellulären Raum sekretiert (Abbildung 4.20 und Tabelle 4.2.1). Die geringen, im Zellkulturüberstand detektierten Mengen des Immunzytokins anti-PDL1-IL15 waren allerdings nicht ganz unerwartet. In der Vergangenheit konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, welche die Expression und Sekretion von IL-15 in eukaryotischen Zellen negativ regulieren. Die IL-15-codierende mRNA weist zum Beispiel im untranslatierten 3'-Sequenzbereich sogenannte Instabilitätssequenzen auf, welche die Stabilität der mRNA herabsetzen und dadurch die Translation von IL-15 limitieren (Jalah et al., 2007). Zusätzlich wird die Translation von IL-15 durch noch ungeklärte Mechanismen durch das IL-15-Signalpeptid oder die Signalpeptid-codierende mRNA-Sequenz gehemmt (Jalah et al., 2007; Kutzler et al., 2005). Durch Codonoptimierung der Fusionsprotein-codierenden DNA-Sequenzen und die Verwendung eines alternativen Signalpeptids, abgeleitet von der schweren IgG-Kette, wurden diese negativen Regulationsmechanismen der IL-15-Expression hier allerdings umgangen. Bergamaschi et al. und Duitman et al. konnten durch Cotransfektionsexperimente jedoch einen weiteren Regulationsmechanismus identifizieren, welcher die Sekretion der bereits gebildeten IL-15 Moleküle limitiert. IL-15 wird, wenn es nach der Expression nicht bereits im ER die IL-15 α -Kette bindet, nur in sehr geringen Mengen sekretiert und in den produzierenden Zellen schnell wieder abgebaut. Erst durch die Komplexbildung mit IL-15 α wird IL-15 effizient in den Golgi-Apparat transportiert und anschließend in den extrazellulären Raum sekretiert. Zusätzlich erhöht die Assoziation mit der IL-15 α -Kette auch die Stabilität des Zytokins, wodurch die Expression und die Halbwertszeit von IL-15 gesteigert wird (Bergamaschi et al., 2008; Duitman et al., 2008). Die Ergebnisse der hier durchgeführten ELISA-Experimente weisen darauf hin, dass auch die IL-15-basierten Immunzytokine von der Coexpression des IL-15 α Sushi-Domäne profitieren und eine gesteigerte Expression und erhöhte Stabilität durch die Assoziation mit der Rezeptordomäne aufweisen.

In mehreren publizierten Studien wurden NK-92 Zellen genetisch modifiziert, um die ektopische Expression von IL-2 oder IL-15 zu ermöglichen. In einer Publikation von Tam et al. wurden NK-92 Zellen zunächst mithilfe DNA-beschichteter Nanopartikel mit IL-2-codierenden DNA-Vektoren transfiziert und anschließend durch Kultivierung in IL-2-freiem Medium selektioniert. Für die Quantifizierung der IL-2-Sekretion mittels ELISA, wurden 10^6 transfizierte und selektionierte NK-92 Zellen für 72 h in 1 ml IL-2-freiem Medium kultiviert. Die durchschnittliche IL-2-Sekretion war mit 2,3 ng/ml (0,157 nM/ml) ungefähr um den Faktor 100 niedriger als die in dieser Arbeit gemessene Sekretion der Immunzytokine durch die CAR NK-92 Zellen. Dieser große Unterschied in der Proteinproduktion durch die NK-92 Zellen könnte auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen wurden die NK-92 Zellen für die Quantifizierung der IL-2 Sekretion in Abwesenheit von exogenem IL-2 kultiviert. Damit die IL-2-

abhängigen NK-92 Zellen weiterhin proliferieren können, wurde sicherlich ein großer Anteil des ektopisch exprimierten IL-2 durch die produzierenden NK-92 Zellen wieder verbraucht und internalisiert. Zusätzlich könnte die Abwesenheit von exogenem IL-2 eine reduzierte Proliferationsrate der NK-92 Zellen zur Folge gehabt haben, wodurch nach 72 h Kultivierung weniger Zellen vorlagen, die IL-2 sekretieren können. Nicht zuletzt sollte bedacht werden, dass seit Publikation der Daten von Tam et al. im Jahr 1998 effizientere Plasmidsysteme und Promotoren entwickelt, sowie Codonoptimierungsstrategien entwickelt wurden, um die Translation von Transgenen zu verbessern.

Genetisch modifizierte T- oder NK-Zellen können abhängig von ihrem Aktivierungszustand eine gesteigerte Transgen-Expression aufweisen. So zeigten zum Beispiel GFP-exprimierende transduzierte T-Zellen nach der Stimulation mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern ein erhöhtes Fluoreszenz-Signal als dieselben unstimulierten T-Zellen. Auch primäre T- und NK-Zellen, welche mit retroviralen Vektoren codierend für IL-15 und einen CD19-spezifischen CAR transduziert wurden, sekretierten nach Cokultivierung mit CD19-exprimierenden Tumorzellen signifikant mehr IL-15 als ruhende CAR-Zellen (Cooper et al., 2004; Hoyos et al., 2010; Liu et al., 2018; Nakazawa et al., 2013). Um zu untersuchen, ob auch die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen eine erhöhte Sekretion der Immunzytokine nach Aktivierung der natürlichen oder der CAR-vermittelten Zytotoxizität aufweisen, wurden die CAR NK-92 Zellen für 72 h in einer *E:T-Ratio* von 1:1 mit MHC-I-negativen K562 oder ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen kokultiviert. Im Gegensatz zu den publizierten Daten zeigte jedoch weder die Aktivierung der natürlichen noch der CAR-vermittelten Zytotoxizität einen statistisch signifikanten Effekt auf die Sekretion der Antikörperfusionsproteine durch die CAR NK-92 Zellen (Abbildung 4.20). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine aktivierungsbedingte Steigerung der Transgen-Expression von den verwendeten Promotoren abhängig ist und der SFFV-Promotor, welcher die Expression der Antikörperfusionsproteine vermittelt, weniger stark durch die Aktivierung der NK-92 Zellen beeinflusst wird.

In weiteren Ansätzen wurden die CAR NK-92 Zellen vor dem Aussäen einer Gammastrahlung von 10 Gy ausgesetzt. Eine solche Bestrahlung wird auch in klinischen Studien als Sicherheitsmaßnahme vor der Infusion von NK-92 Zellen durchgeführt. Die Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen hatte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Menge der in den Zellkulturüberständen detektierten Antikörperfusionsproteine (Abbildung 4.20). Es konnte allerdings tendenziell eine Abnahme in der anti-PDL1-Fc-, anti-PDL1-scIL12- und anti-PDL1-IL15-Sekretion gemessen werden. Die Immunzytokine anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 wurden dagegen auch nach Bestrahlung der CAR NK-92 Zellen in unveränderten Konzentrationen im Kulturüberstand nachgewiesen (Tabelle 4.2.1).

Die reduzierte Sekretion der Antikörperfusionsproteine anti-PDL1-Fc, anti-PDL1-IL15 und anti-PDL1-scIL12 könnte auf ein durch die Bestrahlung induziertes Absterben der NK/92/5.28.z Zellen

zurückgeführt werden. In Studien von Schönfeld et al. wurde gezeigt, dass die Lebensfähigkeit von NK-92/5.28.z Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy graduell abnimmt, bis etwa 72 h nach Bestrahlung alle Zellen abgestorben waren (Schönfeld et al., 2015). Die IL-15-Superagonist-enthaltenden Immunzytokine sind womöglich dazu in der Lage, im Gegensatz zu den anderen Antikörperfusionsproteinen in ausreichenden Mengen überlebensfördernde Signale in den CAR NK-92 Zellen autokrin zu induzieren, wodurch das Absterben der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und der NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen nach Bestrahlung verzögert wird. In weiterführenden Experimenten sollte daher genauer untersucht werden, ob die Strahlensensitivität der CAR NK-92 Zellen durch die Expression der Antikörperfusionsproteine beeinflusst wird.

5.2.2. Autokrine Stimulation der CAR NK-92 Zellen durch die Expression von Immunzytokinen

In Immunoblot-Analysen wurde die autokrine Stimulation der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen durch sekretiertes anti-PDL1-sclL12 nachgewiesen (Abbildung 4.21). Hierfür wurden unveränderte NK-92/5.28.z Zellen und Immunzytokin-sekretierende NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen jeweils für 30 min in X-VIVO⁺⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von 5 ng/ml murinem IL-12 inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate der CAR NK-Zellen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für STAT4, pSTAT4 (pY693) und γ -Tubulin gefärbt. Der Transkriptionsfaktor STAT4 wird nach Aktivierung des IL-12-Rezeptorkomplexes durch die beiden Januskinasen JAK2 und Tyk2 phosphoryliert. Der aktivierte Transkriptionsfaktor ist anschließend in der Lage, Dimere zu bilden, in den Nukleus einzuwandern und dort die Expression von verschiedenen Proteinen wie zum Beispiel dem proinflammatorischen Zytokin IFN γ , dem zytolytischen Protein Perforin oder der Lymphozyten-rekrutierenden Chemokine Mip-1 α und Mip-1 β (engl. *macrophage inflammatory protein*, Mip) einzuleiten (Bacon et al., 1995; Galon et al., 1999; Lund et al., 2004; Yamamoto et al., 2002).

Während im Zelllysat unveränderter NK-92/5.28.z Zellen nur nach Stimulation mit rekombinantem IL-12 eine pSTAT4-spezifische Proteinbande nachgewiesen werden konnte, wurde in den Lysaten der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen sowohl nach Stimulation mit exogenem IL-12 als auch ohne rekombinantes IL-12 phosphoryliertes STAT4 detektiert. Diese Ergebnisse weisen nach, dass das von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen exprimierte anti-PDL1-sclL12 Immunzytokin autokrin auf die CAR NK-92 Zellen zurückwirkt und den IL-12-Signalweg aktiviert. Bei der Immunoblot-Analyse fiel zudem auf, dass die STAT4-Expression in den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen im Vergleich zu den

NK-92/5.28.z Zellen reduziert war. Eine ähnliche Reduktion der STAT4-Expression nach langanhaltender Stimulation mit rekombinantem IL-12 wurde für primäre T-Zellen bereits beschrieben und konnte mit einer reduzierten IFN γ -Sekretion und der Expression verschiedener Erschöpfungsmarker wie Tim-3 und PD-1 in Verbindung gebracht werden (Vacaflores et al., 2017; Wang et al., 2001).

Die autokrine Stimulation der Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.5/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.5/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.5/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen durch die sekretierten IL-15-basierten Immunzytokine konnte in Immunoblot-Analysen durch die Detektion von phosphoryliertem STAT5 nachgewiesen werden (Abbildung 4.22). Hierfür wurden die NK-92/5.28.z Ausgangszellen und die entsprechenden Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-Zellen jeweils für 16 h in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert. Die Zelllysate wurden anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblot-Analysen mit Antikörpern spezifisch für STAT5, pSTAT5 (pY694) und γ -Tubulin untersucht. IL-15 induziert ähnlich wie IL-2 durch die Bindung an den IL-15/IL-2-*intermediate-affinity*-Rezeptor die Aktivierung der beiden Januskinasen JAK1 und JAK3. Die Januskinasen vermitteln anschließend die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5, welche daraufhin dimerisieren und in den Zellkern einwandern, um dort die Transkription verschiedener Gene einzuleiten (Johnston et al., 1995). Die durch IL-15 eingeleiteten JAK/STAT-Signalwege induzieren unter anderem die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Mcl-1 und Bcl-2, oder auch IFN γ , Perforin und Granzymen (Lord et al., 2000). In den Lysaten unveränderter NK-92/5.28.z Zellen wurde nach der Kultivierung in IL-2-freiem Medium ein im Vergleich zu den in IL-2 kultivierten Zellen reduziertes pSTAT5-Signal detektiert. NK-92/5.28.5/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.5/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.5/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen dagegen sowohl in Anwesenheit von exogenem IL-2 als auch nach Entzug von IL-2 ein unverändertes pSTAT5-Signal auf. Diese Ergebnisse weisen nach, dass die IL-15- und IL-15-Superagonist-basierten Immunzytokine tatsächlich autokrin auf die CAR NK-Zellen zurückwirken und in diesen den IL-15-Signalweg aktivieren.

Die Auswirkung der autokrinen Stimulation der CAR NK-92 Zellen durch die exprimierten IL-15-basierten Immunzytokine wurden in Proliferationsexperimenten untersucht. Primäre NK-Zellen wie auch die etablierte NK-Zelllinie NK-92 Zellen sind bei der *in vitro* Kultivierung auf exogenes IL-2 angewiesen. IL-15, ein weiteres proinflammatorisches Zytokin der gemeinsamen gamma-Rezeptorketten-Familie, bindet den gleichen *intermediate-affinity*-Rezeptor und induziert die gleichen Signalwege wie IL-2, wodurch IL-15 auch zur Substitution von IL-2 bei der Kultivierung von NK-Zellen verwendet werden kann (Sim und Radvanyi, 2014; Warren et al., 1996). Werden NK-Zellen genetisch modifiziert, sodass diese IL-2 oder IL-15 ektopisch exprimieren, kann bei der Kultivierung auf den

Zusatz von exogenem IL-2/IL-15 verzichtet werden (Imamura et al., 2014; Konstantinidis et al., 2005; Liu et al., 2018; Sahm et al., 2012; Tam et al., 1999). So waren zum Beispiel NK-92 Zellen, welche humanes IL-15 sekretierten, in der Lage, unabhängig von exogenem IL-2 zu proliferieren und wiesen auch nach längerer Kultivierung ohne IL-2 eine unveränderte Zytotoxizität auf (Sahm et al., 2012).

Für die hier durchgeführten Proliferationsanalysen wurden NK-92/5.28.z und Antikörperfusionsprotein-sekretierende CAR NK-92/5.28.z Zellen für jeweils 6 Tage in X-VIVO⁺ Medium in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert. Die Zellzahlen wurden alle 24 h mithilfe einer Zählkammer mikroskopisch bestimmt (Abbildung 4.23). Immunzytokin-sekretierende NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen in Anwesenheit von exogenem IL-2 eine im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen und zu Miniantikörper- und anti-PDL1-scIL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen signifikant gesteigerte Proliferationsrate auf, wodurch sie am Ende der siebentägigen Kultivierung in höheren Zellzahlen vorlagen (Tabelle 4.3.1). Zudem waren die anti-PDL1-IL15-, anti-PDL1-RD-IL15- oder RD-IL15-anti-PDL1-sekretierenden CAR NK-92 Zellen im Gegensatz zu den unveränderten und den anti-PDL1-Fc- und anti-PDL1-scIL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen in der Lage, über einen längeren Zeitraum auch ohne exogenes IL-2 zu überleben und zu proliferieren. Die Proliferationsrate der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wurde durch den Entzug von IL-2 nicht signifikant beeinflusst. Dies beweist, dass die Expression der IL-15-basierten Immunzytokine ausreichend ist, um die Stimulation mit exogenem IL-2 komplett zu ersetzen.

Alternativ konnte der IL-2-Entzug auch genutzt werden, um die IL-15-/IL-15-Superagonist-sekretierenden NK-92/5.28.z Zellen nach Transduktion zu selektionieren (Abbildung 4.24). Hierfür wurden NK-92/5.28.z Zellen eine Woche nach Transduktion mit lentiviralen Vektorpartikeln, codierend für die IL-15-basierten Immunzytokine, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in IL-2-freiem Medium (X-VIVO⁺) ausgesät. In durchflusszytometrischen Analysen wurde gezeigt, dass während des IL-2-Entzugs der Anteil an iRFP-exprimierenden NK-92 Zellen kontinuierlich zunahm, bis ein Plateau von ungefähr 90 % iRFP-positiven Zellen erreicht wurde. Diese Ergebnisse bestätigen noch einmal die Fähigkeit der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen, durch Expression der IL-15-basierten Immunzytokine IL-2-unabhängig proliferieren zu können. Andererseits wiesen diese Ergebnisse auch nach, dass die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen die Immunzytokine in ausreichenden Mengen sekretierten, um auch umgebende Zellen parakrin zu stimulieren. In Studien von Sahm et al. konnte hingegen, bedingt durch eine geringere IL-15-Expression (<70 pg/ml /2x10⁶ Zellen/10 ml/72 h) der NK-92 Zellen ein nahezu 100 % reiner IL-15-exprimierender NK-92 Zellpool durch Entzug von IL-2 generiert werden (Sahm et al., 2012).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die autokrine Stimulation durch die Immunzytokine einen Einfluss auf die natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität der genmodifizierten CAR NK-92 Zellen hat. Hierfür wurden jeweils unveränderte NK-92/5.28.z und Immunzytokin-sekretierende CAR NK-92 Zellen in zweistündigen Zytotoxizitätsassays mit den etablierten MHC-I-negativen Zelllinien K562 und C1R-neo, sowie den ErbB2-positiven MDA-MB453 und ErbB2-negativen MDA-MB468 Brustkrebszellen als Zielzellen eingesetzt.

NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wiesen jeweils eine zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen vergleichbare natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität auf. Nur die anti-PDL1-sclIL12-sekretierenden CAR NK-Zellen zeigten gegenüber K562, MDA-MB468 und MDA-MB453 Zellen jeweils eine reduzierte natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität. Interessanterweise wurden die MHC-I-negativen C1R-neo Zellen durch die anti-PDL1-sclIL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen jedoch im gleichen Ausmaß lysiert wie durch die anderen eingesetzten CAR NK-92 Zelllinien.

Um zu überprüfen, ob die reduzierte Zytotoxizität der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12 Zellen durch die Immunzytokin-vermittelte anhaltende Aktivierung des IL-12 Signalwegs induziert wird, wurden unveränderte NK-92/5.28.z Ausgangszellen für 14 Tage mit rekombinanten IL-12 (10 oder 300 ng/ml) stimuliert. In weiteren Ansätzen wurden die NK-92/5.28.z Zellen nach der 14-tägigen Stimulation mit IL-12 für weitere 5 Tage in X-VIVO⁺⁺ ohne IL-12 weiter kultiviert. Als Kontrolle dienten NK-92/5.28.z Zellen, welche in X-VIVO⁺⁺ Medium unter normalen Kulturbedingungen gehalten wurden.

In zweistündigen Zytotoxizitätsassays zeigten die mit exogenem IL-12 stimulierten NK-92/5.28.z Zellen jeweils eine reduzierte natürliche Zytotoxizität gegenüber K562 und ErbB2-negativen MDA-MB468 Zellen, als auch eine reduzierte CAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen (Abbildung 4.26). Die Zytotoxizität der CAR NK-92 Zellen konnte abhängig von der zuvor eingesetzten IL-12-Konzentration, in der Erholungsphase ohne IL-12 jedoch wiederhergestellt werden (Abbildung 4.26). NK-92/5.28.z Zellen, welche für 14 Tage mit 10 ng/ml IL-12 stimuliert wurden, zeigten nach der fünftägigen Erholungsphase ohne IL-12 eine natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität vergleichbar mit der von NK-92/5.28.z Zellen unter normalen Kulturbedingungen. NK-92/5.28.z Zellen, die hingegen mit einer wesentlich höheren Konzentration an IL-12 (300 ng/ml, entspricht ungefähr der Menge des durch die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12 Zellen sekretierten Immunzytokins) kultiviert wurden, zeigten auch nach der Erholungsphase noch eine reduzierte natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität.

Die beobachtete Reduktion der Zytotoxizität in den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12 Zellen und in den IL-12-stimulierten NK-92/5.28.z Zellen war unerwartet, da das proinflammatorische Zytokin IL-12 eigentlich dafür bekannt ist die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen gegenüber Tumorzellen zu erhöhen. So wurde durch die Stimulation mit IL-12 in T- und NK-Zellen nicht nur die Sekretion des

proinflammatorischen Zytokins IFN γ , sondern auch die Expression von verschiedenen Proteinen wie TRAIL und Perforin induziert, welche die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen vermitteln (Lund et al., 2004; Yamamoto et al., 2002; Zhang et al., 2008). Zhang et al. zeigten, dass die Stimulation mit IL-12 die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber MICA-exprimierenden Tumorzellen durch Expression von NKG2D auf den NK-Zellen steigert (Zhang et al., 2008). Andererseits konnte in den in dieser Arbeit zuvor durchgeführten Immunoblot-Analysen auch eine Reduktion der STAT4-Expression in den Lysaten der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen nachgewiesen werden, welche auf die Langzeitstimulation mit den IL-12-basierten Immunzytokinen zurückzuführen ist und in primären T-Zellen mit einer reduzierten IFN γ -Sekretion in Verbindung gebracht wurde (Wang et al., 2001). In zukünftigen Experimenten könnte untersucht werden, ob die 14-tägige Stimulation von NK-92/5.28.z Zellen mit IL-12 ebenfalls zu einer reduzierten STAT4-Expression führt und ob neben IFN γ noch weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors STAT4 herunterreguliert werden, welche die reduzierte Zytotoxizität der CAR NK-Zellen bedingen könnten. Eine verringerte Expression einzelner NK-Zellrezeptoren wie NKG2D würde auch erklären, warum die Zytotoxizität der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen nicht gegenüber allen Tumorzelllinien im gleichen Ausmaß reduziert war.

5.2.3. Parakrine Stimulation primärer Immunzellen durch von CAR NK-92 Zellen sekretierte Immunzytokine

In Transwell-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die genmodifizierten CAR NK-92 Zellen durch Sekretion der Antikörperfusionsproteine auch umgebende Immunzellen parakrin stimulieren können. Hierfür wurden die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen räumlich durch einen Transwell-Einsatz getrennt mit PBMCs gesunder Spender kokultiviert. Die von den CAR NK-92 Zellen sekretierten Proteine können durch die Membran des Transwell-Einsatzes diffundieren und auf die primären Immunzellen im abgetrennten Zellkulturkompartiment wirken, während die CAR NK-92 Zellen im Transwell-Einsatz verbleiben und keinen direkten Einfluss auf die separierten primären Immunzellen ausüben.

Für Transwell-Zytotoxizitätsassays wurden jeweils PBMCs gesunder Spender isoliert und als Effektorzellen in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Antikörperfusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen wurden in die Transwell-Einsätze ausgesät. PBMCs und CAR NK-92 Zellen wurden anschließend über Nacht über die Membran getrennt im selben Medium kokultiviert. Am nächsten Tag wurden Calcein Violet-gefärbte K562 Zellen als Zielzellen zu den PBMCs in die 24-Well-Platte gegeben. Als Kontrollen dienten PBMCs, welche allein oder mit unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen in einem

Transwell-Einsatz kokultiviert wurden. Für weitere Kontrollen wurden PMBCs mit definierten Konzentrationen von Zytokinen und rekombinanten aufgereinigten Antikörperperfusionsproteinen in Abwesenheit von NK-92/5.28.z Zellen stimuliert.

Die genmodifizierten NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclIL12, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen waren jeweils dazu in der Lage, die Zytotoxizität der benachbarten PBMCs gegenüber den K562 Zellen zu erhöhen. Da die NK-92/5.28.z Ausgangszellen keinen Einfluss auf die Lyse der K562 Zellen durch PBMCs hatten, weisen diese Ergebnisse nach, dass die sekretierten Immunzytokine mit den enthaltenen proinflammatorischen Zytokindomänen die stimulatorischen Effekte auf die PBMCs vermitteln. Außerdem zeigen die Transwell-Experimente, dass die Immunzytokine durch die CAR NK-92 Zellen auch in ausreichenden Mengen sekretiert werden, um die Zytotoxizität umgebender primärer Immunzellen gegenüber K562 Tumorzellen steigern zu können. Der rekombinante anti-PDL1-Fc Miniantikörper hatte, wie bereits in den in Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Zytotoxizitätsassays gezeigt, keine messbare stimulatorische Wirkung auf die Zytotoxizität der primären Immunzellen. Dementsprechend beeinflussten auch die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc Zellen die Lyse der K562 Zellen durch PBMCs nicht. Grund für die fehlende immunstimulatorische Wirkung des anti-PDL1 Miniantikörpers in diesen Assays ist vermutlich, wie bereits in Abschnitt 5.1.4 diskutiert, die geringe PD-1-Expression auf primären NK-Zellen. Dong et al. zeigten, dass primäre NK-Zellen, welche durch Stimulation mit Tumorzellen oder proinflammatorischen Zytokinen PD-L1-exprimieren, auch unabhängig von PD-1 von der Behandlung mit PD-L1-spezifischen *Immune Checkpoint*-Inhibitoren profitieren und eine gesteigerte Zytotoxizität aufweisen (Dong et al., 2019). Dieser Effekt konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht reproduziert werden, allerdings wurden die primären NK-Zellen auch nicht vorstimuliert, um die Expression von PD-L1 oder PD-1 zu induzieren.

Für eine Transwell-gemischte Lymphozytenreaktion (GLR) wurden jeweils die PBMCs zweier gesunder Spender isoliert. Die PBMCs eines Spenders wurden mit CFSE gefärbt und als Effektorzellen eingesetzt. Für die Stimulatorzellen wurden CD3-negative PBMCs des zweiten Spenders isoliert und mit 25 Gy bestrahlt. Stimulator- und Effektorzellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 zusammen in die Transwell-Einsätze ausgesät. Unveränderte und Immunzytokine-sekretierende NK-92/5.28.z Zellen wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät und die Transwell-Einsätze mit den Immunzellen eingesetzt. Die primären Immunzellen und die CAR NK-Zellen wurden für 7 Tage kokultiviert. Als Kontrolle wurden Effektorzellen alleine ohne Stimulatorzellen und ohne CAR NK-Zellen kultiviert. Für weitere Kontrollen wurden Stimulator- und Effektorzellen mit oder ohne definierte Konzentrationen von Zytokinen und den aufgereinigten Antikörperperfusionsproteinen in Abwesenheit von NK-92/5.28.z Zellen stimuliert. In der Endpunkt-Analyse der GLR wurden die PBMCs mit einem APC-gekoppelten Antikörper spezifisch für CD8 gefärbt und im Durchflusszytometer die proliferierenden CD8⁺ T-Zellen als APC-positive

Zellpopulation mit reduziertem CFSE-Signal detektiert.

PBMCs, welche mit unmodifizierten CAR NK-92/5.28.z Zellen kokultiviert wurden, wiesen im Vergleich zu PBMCs, die ohne NK-92 Zellen kultiviert wurden, am Ende der GLR eine tendenziell leicht reduzierte CD8⁺ T-Zellproliferation auf. Diese Abnahme der CD8⁺ T-Zellproliferation könnte auf den zusätzlichen Nährstoffverbrauch der CAR NK-92 Zellen zurückgehen. Eine weitere mögliche Erklärung für den reduzierten Anteil an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen stellt die Sekretion von Proteinen durch die NK-92/5.28.z Zellen dar, welche die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen hemmen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die ErbB2-spezifische NK-92/5.28.z Zelllinie auch im unstimulierten Zustand neben verschiedenen anderen Proteinen auch IL-10 bereits in detektierbaren Mengen sekretiert. IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin, dessen Funktion im Immunsystem noch nicht komplett aufgeklärt ist. Während verschiedene Studien einen proliferationsinduzierenden Effekt von IL-10 auf T-Zellen zeigten, wiesen einzelne Publikationen wie zum Beispiel von Smith und Kollegen eine hemmende Wirkung von IL-10 auf CD8⁺ T-Zellen nach (Oft, 2014; Smith et al., 2018). Die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-Fc und NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen waren nicht in der Lage, durch die Sekretion der Antikörperfusionsproteine die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen signifikant zu steigern. Nur in den Ansätzen mit den kokultivierten NK-92/5.28.z/anti-PDL1-IL15, NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und NK-92/5.28.z/RD-IL15-anti-PDL1 Zellen wurden jeweils erhöhte Anteile an proliferierenden CFSE^{low} CD8⁺ T-Zellen detektiert. Da alle aufgereinigten Immunzytokine und der anti-PDL1-Fc Miniantikörper im Gegensatz zu den Fusionsprotein-sekretierenden CAR NK-92 Zellen jeweils die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen signifikant steigerten, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass nur die Immunzytokine anti-PDL1-IL15, anti-PDL1-RD-IL15 und RD-IL15-anti-PDL1 von den CAR NK-92 Zellen in ausreichenden Mengen sekretiert werden, um einen immunstimulatorischen Effekt auf die CD8⁺ T-Zellproliferation auszuüben. Tatsächlich lagen die durchschnittlich per ELISA ermittelten Konzentrationen der von den CAR NK-92 Zellen sekretierten Antikörperfusionsproteine zwischen 0,4 nM und 9,5 nM (bezogen auf 10⁶ Zellen die für 72 h in 1 ml Medium kultiviert wurden). Die PBMCs in den Kontrollansätzen wurden hingegen mit 100 nM, also einer etwa 10- bis 200-fach höheren Konzentration an aufgereinigten rekombinanten Antikörperfusionsproteinen stimuliert.

Die Transwell-Einsätze wurden in den hier durchgeführten Experimenten bewusst verwendet, um die immunstimulatorischen Effekte der durch die CAR NK-92 Zellen sekretierten Faktoren unabhängig von Zell-Zell-Kontakten untersuchen zu können. Allerdings wird die immunstimulatorische Wirkung der genmodifizierten CAR NK-92 Zellen nicht allein durch die Expression der Immunzytokine bestimmt, sondern auch durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt. NK-Zellen sind zum Beispiel in der Lage, sich in sogenannten homotypischen Zellverbänden gegenseitig zu stimulieren. Vermittelt durch den Rezeptor 2B4 und die gegenseitige Transpräsentation von IL-2 durch den *high affinity* IL-2-Rezeptor CD25 weisen primäre NK-Zellen im Zellverbund eine signifikant gesteigerte Proliferation und CD25-Expression auf

als NK-Zellen, welche als Einzelzellen separat kultiviert werden (Kim et al., 2017; Kim et al., 2014). Auch zwischen unterschiedlichen Immunzellpopulationen können Zell-Zell-Kontakte stimulierende Effekte induzieren. So zeigen gemeinsam kultivierte T- und NK-Zellen durch die Interaktion zwischen 2B4 auf den NK-Zellen und CD48 auf den T-Zellen jeweils eine gesteigerte Proliferation (Assarsson et al., 2004). Basierend auf diesen Daten kann vermutet werden, dass die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen ohne die artifizielle räumliche Trennung womöglich eine höhere immunstimulatorische Wirkung auf die umgebenden endogenen Immunzellen haben als hier in den Transwell-Assays ermittelt.

5.3. Antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen in einem murinen *in vivo*-Tumormodell

In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Analysen wurde gezeigt, dass die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen selber von den Immunzytokinen autokrin stimuliert werden und dadurch im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen zum Teil vorteilhaftere Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel eine erhöhte Proliferationsrate und die Fähigkeit, unabhängig von exogenem IL-2 zu proliferieren. Der vermutlich größere Vorteil der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen gegenüber unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen liegt allerdings in der parakrinen Stimulation von endogenen Immunzellen durch die sekretierten Immunzytokine und in der Möglichkeit, sie für eine Antitumorreaktion zu mobilisieren. Um die antitumorale Wirkung Immunzytokin-sekretierender NK-92/5.28.z Zellen *in vivo* zu analysieren, wurde ein immunkompetentes Mausmodell mit subkutan injizierten ErbB2-exprimierenden GL261 Glioblastomzellen gewählt.

Vor Beginn der hier durchgeführten *in vivo* Arbeiten wurde zunächst in durchflusszytometrischen Analysen die Expression von murinem PD-L1 und humanem ErbB2 auf der Oberfläche der GL261/ErbB2 Zellen bestätigt. Die laut Literatur bestehende kreuzreaktive Bindung von Atezolizumab an murines PD-L1 wurde durch Färbung der GL261/ErbB2 Zellen mit dem anti-PDL1-Fc Miniantikörper ebenfalls verifiziert (Chatterjee et al., 2016; Irving, 2012). Abschließend wurde in Zytotoxizitätsassays nachgewiesen, dass die GL261/ErbB2 Zellen jeweils eine vergleichbare Sensitivität gegenüber der Lyse durch NK-92/5.28.z und durch die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen aufweisen.

Für die *in vivo* Analyse wurden GL261/ErbB2 Zellen subkutan in die rechte Flanke von weiblichen, sechs Wochen alten C57BL/6 Mäusen injiziert. An Tag 22 nach Tumorinokulation wurden die Mäuse anhand des Tumolvolumens gleichverteilt den verschiedenen Behandlungsgruppen zugeordnet und die

Therapie wurde begonnen. Die Behandlung beinhaltete jeweils acht peritumorale Injektionen von NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen, NK-92/5.28.z Zellen oder zellfreiem Injektionsmedium (je zwei Dosen pro Woche, für vier Wochen). Sowohl die Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen als auch die NK-92/5.28.z Ausgangszellen waren im Gegensatz zu dem zellfreien Injektionsmedium in der Lage, während der Behandlungsphase das Tumolvolumen nach Injektion temporär zu reduzieren. In jeweils zwei Mäusen induzierte die Behandlung mit den NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 und den NK-92/5.28.z Zellen sogar die vollständige Abstoßung des Tumors. In Mäusen, in denen während des Behandlungszeitraums keine vollständige Tumorabstoßung induziert werden konnte, nahm das Tumolvolumen nach Beendigung der Therapie jedoch wieder zu. Diese Ergebnisse weisen nach, dass die CAR NK-92 Zellen *in vivo* aktiv waren, das Tumorwachstum jedoch vermutlich bereits zu weit fortgeschritten war, um in einem Großteil der Mäuse eine vollständige Abstoßung des Tumors auszulösen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die drei Mäuse, welche bei Beginn der Therapie die größten Tumoren aufwiesen, jeweils unabhängig von der angewandten Therapie als erste euthanisiert werden mussten. In Arbeiten von Zhang et al. wurde die antitumorale Wirkung der NK-92/5.28.z Ausgangszellen in einem ähnlichen subkutanen Glioblastommodell mit den gleichen ErbB2-exprimierenden GL261 Zellen untersucht mit dem Unterschied, dass die Therapie bereits an Tag 7 nach Tumordinokulation begonnen wurde (Zhang et al., 2016). Durch den früheren Behandlungsbeginn waren die ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen damals dazu in der Lage, in insgesamt 4 von 5 Tieren die Tumorabstoßung zu induzieren.

Die Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen wiesen im Vergleich zu den unveränderten NK-92/5.28.z Zellen keine gesteigerte antitumorale Wirkung auf. Sowohl die Überlebensrate als auch die induzierte mittlere Überlebensdauer war in den verschiedenen Behandlungsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Grund hierfür könnte, wie bereits bei den Transwell-Experimenten diskutiert, eine zu geringe Sekretion der Immunzytokine durch die NK-92 Zellen sein. *In vivo* ist eine ausreichende Sekretion der Immunzytokine sogar noch kritischer für die antitumorale Wirkung der modifizierten CAR NK-92 Zellen als in *in vitro* Experimenten, da die Immunzytokine *in vivo* vermehrt von umgebenden Zellen durch Pinozytose aufgenommen werden und vermittelt durch das Lymphsystem aus den Geweben abtransportiert werden können (Kontermann, 2011; Ryman und Meibohm, 2017).

Zudem unterliegt die Charakterisierung von humanen zellulären Immuntherapeutika, wie zum Beispiel den NK-92 Zellen, in murinen Tumormodellen gewissen Limitationen, welche bei der Bewertung der Daten beachtet werden müssen. Zum einen werden die NK-92 Zellen aufgrund ihres humanen Hintergrunds von immunkompetenten Mäusen relativ schnell abgestoßen und müssen für eine Therapie mehrfach injiziert werden, um eine antitumorale Wirkung zu erzielen (Zhang et al., 2017). In

zukünftigen Experimenten sollte daher auch untersucht werden, ob die von den CAR NK-92 Zellen sekretierten Immunzytokine die Ausbildung einer Immunantwort gegen die xenogenen NK-92 Zellen fördern können. Eine durch die Immunzytokine beschleunigte Immunreaktion gegen die humanen NK-Zellen und die daraus resultierende verringerte Persistenz der NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen würde erklären, warum die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen im Vergleich zu den NK-92/5.28.z Ausgangszellen keine erhöhte antitumorale Wirkung aufweisen konnten.

Außerdem besteht die Problematik, dass nicht alle von den NK-92 Zellen exprimierten und sekretierten Faktoren kreuzreaktiv auf die murinen Immunzellen wirken, und auch umgekehrt die NK-92 Zellen nicht von allen murinen Zytokinen stimuliert werden. Ein Beispiel hierfür ist das proinflammatorische Zytokin IFN γ , welches zwar von den aktivierten NK-92/5.28.z Zellen in großen Mengen sekretiert wird, jedoch nicht auf murine Immunzellen wirkt (Hemmi et al., 1992). IFN γ induziert zum einen die Expression von MHC-I auf Tumorzellen, zum anderen auch die Expression von MHC-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Die durch IFN γ -induzierte gesteigerte Antigenpräsentation fördert CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zell-vermittelte Antitumorreaktionen (Schroder et al., 2004). Andererseits wird durch die Stimulation mit IFN γ auch die Expression von PD-L1 induziert, weshalb die Sekretion der PD-L1-spezifischen Immunzytokine grundsätzlich eine sinnvolle Modifizierung der CAR NK-92 Zellen darstellt, um die endogene Antitumorreaktion zu verstärken (Keir et al., 2008). Um diese Problematik in Zukunft zu umgehen, könnten auch murine Immunzytokin-sekretierende CAR NK-Zellen generiert werden, welche als analoges Zelltherapeutikum zu den humanen NK-92 Zellen in murinen Tumormodellen eingesetzt werden könnten. Einen weiteren möglichen Lösungsansatz stellt die Verwendung von humanisierten Mäusen dar, wie zum Beispiel von NOD scid gamma (NSG)-Mausstämmen. Humanisierte Mäuse entwickeln nach Transplantation von humanen PBMCs oder auch CD34 $^{+}$ hämatopoetischen Stammzellen ein artifizielles humanes Immunsystem, welches erlaubt Interaktionen zwischen verschiedenen Immunzellpopulationen und humanen Zelltherapeutika zu analysieren. Allerdings weisen humanisierte Mäuse den Nachteil auf, dass diese bereits nach relativ kurzer Zeit eine akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion entwickeln, welche nur kurzzeitige *in vivo* Studien zulassen, bevor die Tiere euthanisiert werden müssen (Allen et al., 2019).

5.4. Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurde die ErbB2-spezifische CAR NK-92/5.28.z Zelllinie genetisch modifiziert, um die ektopische Expression von verschiedenen immunstimulatorischen Immunzytokinen zu ermöglichen. In *in vitro* Versuchen wurde nachgewiesen, dass die genmodifizierten CAR NK-Zellen die Immunzytokine exprimieren und autokrin durch diese stimuliert werden. In Transwell-Experimenten wurde zudem gezeigt, dass auch umgebende primäre Immunzellen durch die von den NK-92 Zellen sekretierten Immunzytokine stimuliert werden können. Allerdings war die Sekretion der Antikörperfusionsproteine, insbesondere des anti-PDL1-Fc Miniantikörpers und der Immunzytokine anti-PDL1-sclL12 und anti-PDL1-IL15, nicht immer ausreichend, um signifikante Effekte in den primären Immunzellen auszulösen. Auch in einem immunkompetenten Mausmodell zeigten die Immunzytokin-sekretierenden NK-92/5.28.z/anti-PDL1-RD-IL15 Zellen keine höhere antitumorale Aktivität als die NK-92/5.28.z Ausgangszellen.

Da die stimulatorische Wirkung der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen vermutlich zum Großteil durch die Menge der sekretierten Immunzytokine limitiert wird, sollte in zukünftigen Arbeiten der Fokus auf die Steigerung der Expression der Antikörperfusionsproteine durch die CAR NK-92 Zellen gelegt werden. Eine Möglichkeit, die Immunzytokin-Sekretion durch die CAR NK-92 Zellen zu erhöhen, stellt der Einsatz von alternativen Promotoren oder die Verwendung von weiteren cis-wirkenden Elementen im Vektor dar, welche allein oder in Kombination mit dem derzeit genutzten WPRE (engl. *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*) die Transkription der Transgene steigern (Wang et al., 2018).

Neben kontinuierlich aktiven Promotoren, welche die konstitutive Expression eines Transgens vermitteln, wäre es auch interessant, Promotoren einzusetzen, die eine aktivierungsbedingte/induzierbare Expression der Antikörperfusionsproteine erlauben. Insbesondere die anti-PDL1-sclL12-sekretierenden CAR NK-92 Zellen könnten von solch einer kontrollierten Immunzytokinsekretion profitieren, da die NK-92/5.28.z/anti-PDL1-sclL12 Zellen nicht bereits während der Kultivierung durch die anhaltende autokrine Stimulation durch das IL-12-basierte Immunzytokin in ihrer Zytotoxizität eingeschränkt würden. Chmielewski et al. und Zhang et al. verwendeten zum Beispiel jeweils einen minimalen IL-2 Promotor, welcher am 5'-Ende mehrere Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NFAT (engl. *nuclear factor of activated T-cells*) enthält, um eine aktivierungs-induzierte, TCR- oder CAR-vermittelte Transgen-Expression in primären T-Zellen zu ermöglichen (Chmielewski et al., 2011; Zhang et al., 2011). In NK-92 Zellen ist die aktivierungsbedingte Transgen-Expression mithilfe eines solchen minimalen IL-2 Promotors mit NFAT-Bindestellen ebenfalls möglich. NK-92/5.28.z Zellen, welche mit einem GFP-codierenden Vektor mit solch einem minimalen IL-2

Promotor mit NFAT-Bindestellen genetisch modifiziert wurden, exprimierten GFP nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin oder nach Cokultivierung mit K562 oder ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Synthetische Notch-Rezeptoren (synNotch) stellen eine weitere Möglichkeit dar, um die Expression eines Transgens Antigen-abhängig zu steuern (Roybal et al., 2016; Srivastava et al., 2019). SynNotch-Rezeptoren sind chimäre Transmembranproteine, welche eine extrazelluläre Antigenbindestelle besitzen und nach Bindung des Antigens durch proteolytische Spaltung intrazellulär einen Transkriptionsfaktor entlassen (Morsut et al., 2016). Der entlassene Transkriptionsfaktor ist anschließend in der Lage, in den Zellkern einzuwandern und die Transkription eines Transgens einzuleiten. Eine synNotch-kontrollierte Transgen-Expression würde zudem den Vorteil bieten, dass CAR und synNotch-Rezeptor gegen unterschiedliche Zielantigene gerichtet und somit die CAR-vermittelte Zytotoxizität und die Transgen-Expression unabhängig voneinander induziert werden können.

Eine alternative Strategie zur Optimierung Immunzytokin-sekretierender CAR NK-92 Zellen wäre eine zusätzliche genetische Modifikation, um die Expression von immunrekutierenden Chemokinen zu ermöglichen. Die von den CAR NK-92 Zellen sekretierten PD-L1-spezifischen Immunzytokine sind, wie in den hier durchgeführten *in vitro* Analysen nachgewiesen wurde, in der Lage, umgebende Immunzellen zu stimulieren. Die Immunzytokine werden durch die CAR NK-92 Zellen am Tumorort sekretiert und dort durch die Bindung an PD-L1 konzentriert. Diese lokale Anreicherung der PD-L1-spezifischen Immunzytokine am Tumor dient als Sicherheitsmaßnahme, um die systemische Aktivierung von Immunzellen durch die Immunzytokine und dadurch resultierende Toxizitäten zu vermeiden. Allerdings werden aufgrund dieser örtlichen Begrenzung der Immunzytokin-Aktivität auch nur endogene Immunzellen stimuliert, welche sich bereits am Tumorort befinden. Die ektopische Expression von Chemokinen könnte helfen, endogene Immunzellen an immunologisch "kalte" Tumoren zu rekrutieren, bevor diese anschließend durch die Immunzytokine aktiviert werden. Adachi und Kollegen entwickelten IL-7- und CCL19 (engl. *CC-chemokine ligand 19*)-sekretierende CAR T-Zellen spezifisch gerichtet gegen CD20 oder Mesothelin (Adachi et al., 2018). Durch die gleichzeitige Sekretion von IL-7 und CCL19 konnte sowohl *in vitro* die Migration von DCs und T-Zellen gesteigert als auch *in vivo* eine erhöhte Anzahl an tumorinfiltrierenden T-Zellen und DCs rekrutiert werden. Die IL-7- und CCL19-sekretierenden CAR T-Zellen kontrollierten zudem in verschiedenen immunkompetenten Mausmodellen jeweils das Tumorwachstum effektiver als konventionelle CAR T-Zellen oder CAR T-Zellen, die nur IL-7 oder CCL19 sekretierten.

Insgesamt stellen die Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92/5.28.z Zellen eine vielversprechende Modifikation der zurzeit bestehenden CAR NK-92/5.28.z Zelllinie dar, die nach einer sicher noch

sinnvollen weiteren Optimierung auch für die klinische Anwendung interessant ist.

Da die Analyse der antitumoralen Wirkung von humanen zellulären Immuntherapeutika in murinen Tumormodellen wie zuvor bereits erörtert gewissen Limitationen unterliegt, erscheinen weitere Anstrengungen notwendig, um zukünftig die Aktivität der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-Zellen in murinen Tumormodellen besser erfassen zu können. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür stellt eine weitere genetische Modifikation der Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-92 Zellen dar, um die aktivierungsbedingte Sekretion von murinem IFN γ und anderen murinen Zytokinen zu ermöglichen. Durch die gleichzeitige Expression von humanen und murinen Zytokinen würde die Problematik gelöst werden, dass ein Teil der von den humanen NK-92 Zellen sekretierten Zytokine nicht kreuzreaktiv auf murine Immunzellen wirkt. Eine so modifizierte CAR NK-92 Zelllinie könnte sowohl die adoptiv transferierten humanen NK-92 Zellen selbst als auch endogene murine Immunzellen aktivieren und zu einer verbesserten Antitumorreaktion führen. Einen alternativen Lösungsansatz stellt die Generierung eines murinen Immunzytokin-sekretierenden CAR NK-Zellprodukts dar, welches anstatt der humanen NK-92 Zellen für die Analyse der antitumoralen Wirkung in murinen *in vivo* Studien eingesetzt werden könnte. Humanisierte Mäuse, welche nach Transplantation von humanen PBMCs oder CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen ein artifizielles humanes Immunsystem entwickeln, könnten ebenfalls verwendet werden, um die Antitumoraktivität der CAR NK-92 Zellen und die parakrine Stimulation von umgebenden Immunzellen durch die sekretierten Immunzytokine *in vivo* zu analysieren. Da humanisierte Mäuse jedoch in der Regel bereits kurze Zeit nach Transplantation der humanen Immunzellen akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen entwickeln, ist der für Therapieversuche zur Verfügung stehende Behandlungszeitraum begrenzt.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi, K., Kano, Y., Nagai, T., Okuyama, N., Sakoda, Y., and Tamada, K. (2018). IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol* 36, 346-351.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765-772.
- Agus, D.B., Akita, R.W., Fox, W.D., Lewis, G.D., Higgins, B., Pisacane, P.I., Lofgren, J.A., Tindell, C., Evans, D.P., Maiese, K., *et al.* (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2, 127-137.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544.
- Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S.A. (2006). IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107, 2409-2414.
- Ahmed, N., Brawley, V.S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., Liu, E., Dakhova, O., Ashoori, A., Corder, A., *et al.* (2015). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 33, 1688-1696.
- Albertini, M.R., Hank, J.A., Gadbaw, B., Kostlevy, J., Haldeman, J., Schalch, H., Gan, J., Kim, K., Eickhoff, J., Gillies, S.D., *et al.* (2012). Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 61, 2261-2271.
- Allen, T.M., Brehm, M.A., Bridges, S., Ferguson, S., Kumar, P., Mirochnitchenko, O., Palucka, K., Pelanda, R., Sanders-Beer, B., Shultz, L.D., *et al.* (2019). Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities. *Nat Immunol* 20, 770-774.
- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B.Y., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res-Dordr* 25, 2097-2116.
- Andersen, R., Donia, M., Ellebaek, E., Borch, T.H., Kongsted, P., Iversen, T.Z., Holmich, L.R., Hendel, H.W., Met, O., Andersen, M.H., *et al.* (2016). Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen. *Clin Cancer Res* 22, 3734-3745.
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J., and Klingemann, H. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy* 10, 625-632.
- Arce Vargas, F., Furness, A.J.S., Litchfield, K., Joshi, K., Rosenthal, R., Ghorani, E., Solomon, I., Lesko, M.H., Ruef, N., Roddie, C., *et al.* (2018). Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell* 33, 649-663 e644.
- Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., and Boyman, O. (2015). Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol* 36, 763-777.

- Assarsson, E., Kambayashi, T., Schatzle, J.D., Cramer, S.O., von Bonin, A., Jensen, P.E., Ljunggren, H.-G., and Chambers, B.J. (2004). NK Cells Stimulate Proliferation of T and NK Cells through 2B4/CD48 Interactions. *The Journal of Immunology* 173, 174-180.
- Assi, H.I., Kamphorst, A.O., Moukalled, N.M., and Ramalingam, S.S. (2018). Immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 124, 248-261.
- Atkins, M.B., Robertson, M.J., Gordon, M., Lotze, M.T., DeCoste, M., DuBois, J.S., Ritz, J., Sandler, A.B., Edington, H.D., Garzone, P.D., *et al.* (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3, 409-417.
- Austin, J.W., Lu, P.Y., Majumder, P., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2014). STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF Regulate PD-1 through Multiple Novel Regulatory Regions in Murine T Cells. *Journal of Immunology* 192, 4876-4886.
- Axelrod, R.S., Havas, H.F., Murasko, D.M., Bushnell, B., and Guan, C.F. (1988). Effect of the mixed bacterial vaccine on the immune response of patients with non-small cell lung cancer and refractory malignancies. *Cancer* 61, 2219-2230.
- Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, A.S., Flies, S.J., and Chen, L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 3635-3643.
- Bachmann, M. (2019). The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells. *Immunol Lett* 211, 13-22.
- Bacon, C.M., Petricoin, E.F., 3rd, Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Larner, A.C., Johnston, J.A., and O'Shea, J.J. (1995). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7307-7311.
- Bai, J., Gao, Z., Li, X., Dong, L., Han, W., and Nie, J. (2017). Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget* 8, 110693-110707.
- Bakhtiar, R. (2016). Antibody drug conjugates. *Biotechnol Lett* 38, 1655-1664.
- Batlle, E., and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 23, 1124-1134.
- Benson, D.M., and Caligiuri, M.A. (2014). Killer Immunoglobulin-like Receptors and Tumor Immunity. *Cancer Immunology Research* 2, 99-104.
- Benson, D.M., Jr., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., *et al.* (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286-2294.
- Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., Alicea, C., Zhang, G.M., Patel, V., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (2008). Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J Biol Chem* 283, 4189-4199.
- Bernin, H., Fehling, H., Marggraff, C., Tannich, E., and Lotter, H. (2016). The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. *Med Microbiol Immunol* 205, 321-332.

- Bessard, A., Sole, V., Bouchaud, G., Quemener, A., and Jacques, Y. (2009). High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 8, 2736-2745.
- Bi, X.W., Wang, H., Zhang, W.W., Wang, J.H., Liu, W.J., Xia, Z.J., Huang, H.Q., Jiang, W.Q., Zhang, Y.J., and Wang, L. (2016). PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF-kappaB pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 9, 109.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 14, 359-370.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A.C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., and Gajewski, T.F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 64, 1140-1145.
- Boissel, L., Betancur, M., Lu, W., Wels, W.S., Marino, T., Van Etten, R.A., and Klingemann, H. (2012). Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. *Leuk Lymphoma* 53, 958-965.
- Boissel, L., Betancur, M., Wels, W.S., Tuncer, H., and Klingemann, H. (2009). Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res* 33, 1255-1259.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *Journal of Experimental Medicine* 187, 813-818.
- Boyiadzis, M., Agha, M., Redner, R.L., Sehgal, A., Im, A., Hou, J.Z., Farah, R., Dorritie, K.A., Raptis, A., Lim, S.H., *et al.* (2017). Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy* 19, 1225-1232.
- Brandstadter, J.D., and Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun* 3, 274-279.
- Brischwein, K., Parr, L., Pflanz, S., Volkland, J., Lumsden, J., Klinger, M., Locher, M., Hammond, S.A., Kiener, P., Kufer, P., *et al.* (2007). Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J Immunother* 30, 798-807.
- Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., and Freeman, G.J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170, 1257-1266.
- Brudno, J.N., and Kochenderfer, J.N. (2016). Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 127, 3321-3330.
- Brudno, J.N., and Kochenderfer, J.N. (2018). Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 31-46.
- Brudno, J.N., Somerville, R.P.T., Shi, V., Rose, J.J., Halverson, D.C., Fowler, D.H., Gea-Banacloche, J.C., Pavletic, S.Z., Hickstein, D.D., Lu, T.Y.L., *et al.* (2016). Allogeneic T Cells That Express an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor Induce Remissions of B-Cell Malignancies That Progress After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Without Causing Graft-Versus-Host Disease. *Journal of Clinical Oncology* 34, 1112-+.

- Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178, 1223-1230.
- Brunner-Weinzierl, M.C., and Rudd, C.E. (2018). CTLA-4 and PD-1 Control of T-Cell Motility and Migration: Implications for Tumor Immunotherapy. *Front Immunol* 9, 2737.
- Buermann, A., Romermann, D., Baars, W., Hundrieser, J., Klempnauer, J., and Schwinzer, R. (2016). Inhibition of B-cell activation and antibody production by triggering inhibitory signals via the PD-1/PD-ligand pathway. *Xenotransplantation* 23, 347-356.
- Buhtoiarov, I.N., Neal, Z.C., Gan, J., Buhtoiarova, T.N., Patankar, M.S., Gubbels, J.A., Hank, J.A., Yamane, B., Rakhmievich, A.L., Reisfeld, R.A., *et al.* (2011). Differential internalization of hu14.18-IL2 immunocytokine by NK and tumor cell: impact on conjugation, cytotoxicity, and targeting. *J Leukoc Biol* 89, 625-638.
- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D.L., and Ma, A. (2004). Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 200, 825-834.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779-786.
- Bustos-Moran, E., Blas-Rus, N., Martin-Cofreces, N.B., and Sanchez-Madrid, F. (2016). Orchestrating Lymphocyte Polarity in Cognate Immune Cell-Cell Interactions. *Int Rev Cell Mol Biol* 327, 195-261.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111-122.
- Butte, M.J., Pena-Cruz, V., Kim, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Molecular Immunology* 45, 3567-3572.
- Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhal, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., *et al.* (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3360-3365.
- Cartellieri, M., Feldmann, A., Koristka, S., Arndt, C., Loff, S., Ehninger, A., von Bonin, M., Bejestani, E.P., Ehninger, G., and Bachmann, M.P. (2016). Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J* 6, e458.
- Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257, 7847-7851.
- Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P., Layton, J., Duhrsen, U., Burgess, A.W., Nice, E., and Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem* 265, 4483-4491.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143, 1283-1289.

- Chatterjee, S., Lesniak, W.G., Gabrielson, M., Lisok, A., Wharram, B., Sysa-Shah, P., Azad, B.B., Pomper, M.G., and Nimmagadda, S. (2016). A humanized antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-L1 expression in tumors. *Oncotarget* 7, 10215-10227.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *Journal of Immunology* 173, 945-954.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.
- Cherkassky, L., Morello, A., Villena-Vargas, J., Feng, Y., Dimitrov, D.S., Jones, D.R., Sadelain, M., and Adusumilli, P.S. (2016). Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *Journal of Clinical Investigation* 126, 3130-3144.
- Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A.A., and Abken, H. (2011). IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 71, 5697-5706.
- Chowdhury, F.Z., Ramos, H.J., Davis, L.S., Forman, J., and Farrar, J.D. (2011). IL-12 selectively programs effector pathways that are stably expressed in human CD8(+) effector memory T cells in vivo. *Blood* 118, 3890-3900.
- Coley, W.B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.
- Concha-Benavente, F., Srivastava, R., Ferrone, S., and Ferris, R.L. (2016). Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. *Oral Oncol* 58, 52-58.
- Cooley, S., Weisdorf, D.J., Guethlein, L.A., Klein, J.P., Wang, T., Le, C.T., Marsh, S.G., Geraghty, D., Spellman, S., Haagensohn, M.D., *et al.* (2010). Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 116, 2411-2419.
- Cooper, L.J., Topp, M.S., Pinzon, C., Plavec, I., Jensen, M.C., Riddell, S.R., and Greenberg, P.D. (2004). Enhanced transgene expression in quiescent and activated human CD8+ T cells. *Hum Gene Ther* 15, 648-658.
- Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14, 135-146.
- Czajkowsky, D.M., Hu, J., Shao, Z., and Pleass, R.J. (2012). Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol Med* 4, 1015-1028.
- Dahlen, E., Veitonmaki, N., and Norlen, P. (2018). Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Ther Adv Vaccines Immunother* 6, 3-17.
- Davies, A.M., and Sutton, B.J. (2015). Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev* 268, 139-159.

Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354.

De Munter, S., Ingels, J., Goetgeluk, G., Bonte, S., Pille, M., Weening, K., Kerre, T., Abken, H., and Vandekerckhove, B. (2018). Nanobody Based Dual Specific CARs. *Int J Mol Sci* 19.

Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., and Thrasher, A.J. (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-813.

DeRenzo, C., and Gottschalk, S. (2019). Genetic Modification Strategies to Enhance CAR T Cell Persistence for Patients With Solid Tumors. *Front Immunol* 10, 218.

Di Stasi, A., Tey, S.-K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A.G., Grilley, B., *et al.* (2011). Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *New Engl J Med* 365, 1673-1683.

Dong, W.J., Wu, X.J., Ma, S.B., Wang, Y.F., Nalin, A.P., Zhu, Z., Zhang, J.Y., Benson, D.M., He, K., Caligiuri, M.A., *et al.* (2019). The Mechanism of Anti-PD-L1 Antibody Efficacy against PD-L1-Negative Tumors Identifies NK Cells Expressing PD-L1 as a Cytolytic Effector. *Cancer Discov* 9, 1422-1437.

Dong, Y., Sun, Q., and Zhang, X. (2017). PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget* 8, 2171-2186.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., *et al.* (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26, 5233-5239.

Duitman, E.H., Orinska, Z., Bulanova, E., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2008). How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: Lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Mol Cell Biol* 28, 4851-4861.

Ehrlich, P.D.P. (1909). UEBER DEN JETZIGEN STAND DER KARZINOMFORSCHUNG. *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde* 5.

Elgundi, Z., Reslan, M., Cruz, E., Sifniotis, V., and Kayser, V. (2017). The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 122, 2-19.

Enblad, G., Karlsson, H., Gammelgard, G., Wenthe, J., Lovgren, T., Amini, R.M., Wikstrom, K.I., Essand, M., Savoldo, B., Hallbook, H., *et al.* (2018). A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia. *Clinical Cancer Research* 24, 6185-6194.

Eppihimer, M.J., Gunn, J., Freeman, G.J., Greenfield, E.A., Chernova, T., Erickson, J., and Leonard, J.P. (2002). Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 9, 133-145.

Escors, D., Gato-Canas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., Garcia-Granda, M.J., Vera, R., and Kochan, G. (2018). The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct Tar* 3.

- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D.G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 720-724.
- Fallon, J., Tighe, R., Kradjian, G., Guzman, W., Bernhardt, A., Neuteboom, B., Lan, Y., Sabzevari, H., Schlom, J., and Greiner, J.W. (2014). The immunocytokine NHS-IL12 as a potential cancer therapeutic. *Oncotarget* 5, 1869-1884.
- Fallon, J.K., Vandeveer, A.J., Schlom, J., and Greiner, J.W. (2017). Enhanced antitumor effects by combining an IL-12/anti-DNA fusion protein with avelumab, an anti-PD-L1 antibody. *Oncotarget* 8, 20558-20571.
- Fedorov, V.D., Themeli, M., and Sadelain, M. (2013). PD-1-and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses. *Science Translational Medicine* 5.
- Francisco, L.M., Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236, 219-242.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015-3029.
- Fry, T.J., Shah, N.N., Orentas, R.J., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C.M., Ramakrishna, S., Wolters, P., Martin, S., Delbrook, C., Yates, B., *et al.* (2018). CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature Medicine* 24, 20-+.
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Imai, C., Mullighan, C.G., and Campana, D. (2009). Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol* 145, 606-613.
- Galon, J., Sudarshan, C., Ito, S., Finbloom, D., and O'Shea, J.J. (1999). IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 162, 7256-7262.
- Gargett, T., and Brown, M.P. (2014). The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in Pharmacology* 5.
- Gattinoni, L., Finkelstein, S.E., Klebanoff, C.A., Antony, P.A., Palmer, D.C., Spiess, P.J., Hwang, L.N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D.M., *et al.* (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202, 907-912.
- Gerber, S.A., Moran, J.P., Frelinger, J.G., Frelinger, J.A., Fenton, B.M., and Lord, E.M. (2003). Mechanism of IL-12 mediated alterations in tumour blood vessel morphology: analysis using whole-tissue mounts. *Brit J Cancer* 88, 1453-1461.
- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L., Familletti, P.C., Gubler, U., Presky, D.H., Stern, A.S., and Gately, M.K. (1995). Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25, 200-206.
- Goldstein, G., Fuccello, A.J., Norman, D.J., Shield, C.F., 3rd, Colvin, R.B., and Cosimi, A.B. (1986). OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *Transplantation* 42, 507-511.

- Gong, J.H., Maki, G., and Klingemann, H.G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8, 652-658.
- Goulmy, E. (1997). Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 157, 125-140.
- Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D.R., Ghazi, A., Brawley, V.S., Corder, A., Schonfeld, K., Koch, J., Dotti, G., *et al.* (2013). TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e105.
- Graham, C., Jozwik, A., Pepper, A., and Benjamin, R. (2018). Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? *Cells-Basel* 7.
- Green, L.L., Hardy, M.C., Maynardcurrie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., *et al.* (1994). Antigen-Specific Human Monoclonal-Antibodies from Mice Engineered with Human Ig Heavy and Light-Chain Yacs. *Nat Genet* 7, 13-21.
- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., and Rosenberg, S.A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155, 1823-1841.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Guedan, S., Calderon, H., Posey, A.D., Jr., and Maus, M.V. (2019). Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 12, 145-156.
- Gupta, R.A., and DuBois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer* 1, 11-21.
- Han, K.P., Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., Yovandich, J.L., Vyas, V.V., Marcus, W.D., Chavallaz, P.A., Romero, C.A., *et al.* (2011). IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine* 56, 804-810.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., and (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.
- Hebeisen, M., Baitsch, L., Presotto, D., Baumgaertner, P., Romero, P., Michielin, O., Speiser, D.E., and Rufer, N. (2013). SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *J Clin Invest* 123, 1044-1056.
- Hegde, M., Mukherjee, M., Grada, Z., Pignata, A., Landi, D., Navai, S.A., Wakefield, A., Fousek, K., Bielamowicz, K., Chow, K.K.H., *et al.* (2016). Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R alpha 2 mitigate tumor antigen escape. *Journal of Clinical Investigation* 126, 3036-3052.

- Hemmi, S., Merlin, G., and Aguet, M. (1992). Functional characterization of a hybrid human-mouse interferon gamma receptor: evidence for species-specific interaction of the extracellular receptor domain with a putative signal transducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2737-2741.
- Herbst, R.S., Soria, J.C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., *et al.* (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515, 563-567.
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H.D., Wang, S.D., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D.B., Lau, J.S., Zhu, G.F., *et al.* (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Research* 65, 1089-1096.
- Hombach, A.A., Rappl, G., and Abken, H. (2013). Arming Cytokine-induced Killer Cells With Chimeric Antigen Receptors: CD28 Outperforms Combined CD28 OX40 "Super-stimulation". *Molecular Therapy* 21, 2268-2277.
- Hoyos, V., Savoldo, B., Quintarelli, C., Mahendravada, A., Zhang, M., Vera, J., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Brenner, M.K., and Dotti, G. (2010). Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24, 1160-1170.
- Hsu, J., Hodgins, J.J., Marathe, M., Nicolai, C.J., Bourgeois-Daigneault, M.C., Trevino, T.N., Azimi, C.S., Scheer, A.K., Randolph, H.E., Thompson, T.W., *et al.* (2018). Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest* 128, 4654-4668.
- Huehls, A.M., Coupet, T.A., and Sentman, C.L. (2015). Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology* 93, 290-296.
- Hurton, L.V., Singh, H., Najjar, A.M., Switzer, K.C., Mi, T., Maiti, S., Olivares, S., Rabinovich, B., Huls, H., Forget, M.A., *et al.* (2016). Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E7788-E7797.
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I.C., Pui, C.H., Geiger, T.L., and Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 676-684.
- Imamura, M., Shook, D., Kamiya, T., Shimasaki, N., Chai, S.M., Coustan-Smith, E., Imai, C., and Campana, D. (2014). Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15. *Blood* 124, 1081-1088.
- Irving, B.C., H.; Maecker H; Mariathasan S; Lehar SM; Wu Y; Cheung J. (2012). Anti-PD-L1 Antibodies, compositions and articles of manufacture. . USA: Genentech, Inc *Office USP, editor*.
- Jacobson, C.A., Locke, F.L., Miklos, D.B., Herrera, A.F., Westin, J.R., Lee, J., Rossi, J.M., Zheng, L.Q., Avanzi, M.P., Roberts, Z.J., *et al.* (2018). End of Phase 1 Results from Zuma-6: Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) in Combination with Atezolizumab for the Treatment of Patients with Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Blood* 132.
- Jakobisiak, M., Golab, J., and Lasek, W. (2011). Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth F R* 22, 99-108.
- Jalah, R., Rosati, M., Kulkarni, V., Patel, V., Bergamaschi, C., Valentin, A., Zhang, G.M., Sidhu, M.K., Eldridge, J.H., Weiner, D.B., *et al.* (2007). Efficient systemic expression of bioactive IL-15 in mice upon delivery of optimized DNA expression plasmids. *DNA Cell Biol* 26, 827-840.

- Jennewein, M.F., and Alter, G. (2017). The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends Immunol* 38, 358-372.
- Jiang, T., Zhou, C., and Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, e1163462.
- Jochems, C., Hodge, J.W., Fantini, M., Fujii, R., Morillon, Y.M., 2nd, Greiner, J.W., Padgett, M.R., Tritsch, S.R., Tsang, K.Y., Campbell, K.S., *et al.* (2016). An NK cell line (haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele. *Oncotarget* 7, 86359-86373.
- Jochems, C., Tritsch, S.R., Knudson, K.M., Gameiro, S.R., Rumfield, C.S., Pellom, S.T., Morillon, Y.M., Newman, R., Marcus, W., Szeto, C., *et al.* (2019). The multi-functionality of N-809, a novel fusion protein encompassing anti-PD-L1 and the IL-15 superagonist fusion complex. *Oncoimmunology* 8, e1532764.
- John, L.B., Devaud, C., Duong, C.P.M., Yong, C.S., Beavis, P.A., Haynes, N.M., Chow, M.T., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2013). Anti-PD-1 Antibody Therapy Potently Enhances the Eradication of Established Tumors By Gene-Modified T Cells. *Clinical Cancer Research* 19, 5636-5646.
- Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R., *et al.* (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535-546.
- Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D., *et al.* (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8705-8709.
- Jones, B.S., Lamb, L.S., Goldman, F., and Di Stasi, A. (2014). Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 5, 254.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human-Antibody with Those from a Mouse. *Nature* 321, 522-525.
- Jostock, T., Vanhove, M., Brepoels, E., Van Gool, R., Daukandt, M., Wehnert, A., Van Hegelsom, R., Dransfield, D., Sexton, D., Devlin, M., *et al.* (2004). Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-on-phage display libraries. *J Immunol Methods* 289, 65-80.
- June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S., and Milone, M.C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 359, 1361-1365.
- June, C.H., Riddell, S.R., and Schumacher, T.N. (2015). Adoptive cellular therapy: a race to the finish line. *Sci Transl Med* 7, 280ps287.
- Kantarjian, H., Stein, A., Gokbuget, N., Fielding, A.K., Schuh, A.C., Ribera, J.M., Wei, A., Dombret, H., Foa, R., Bassan, R., *et al.* (2017). Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 376, 836-847.
- Karbach, J., Neumann, A., Brand, K., Wahle, C., Siegel, E., Maeurer, M., Ritter, E., Tsuji, T., Gnjjatic, S., Old, L.J., *et al.* (2012). Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: immunological effects and clinical activity. *Clin Cancer Res* 18, 5449-5459.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062-1078.

- Kawano, T., Nakayama, T., Kamada, N., Kaneko, Y., Harada, M., Ogura, N., Akutsu, Y., Motohashi, S., Iizasa, T., Endo, H., *et al.* (1999). Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24 NKT cells. *Cancer Res* 59, 5102-5105.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704.
- Kerkar, S.P., Muranski, P., Kaiser, A., Boni, A., Sanchez-Perez, L., Yu, Z., Palmer, D.C., Reger, R.N., Borman, Z.A., Zhang, L., *et al.* (2010). Tumor-specific CD8⁺ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer Res* 70, 6725-6734.
- Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., *et al.* (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12, 6106-6115.
- Khalil, D.N., Smith, E.L., Brentjens, R.J., and Wolchok, J.D. (2016). The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 394.
- Kim, M., Kim, T.-J., Kim, H.M., Doh, J., and Lee, K.-M. (2017). Multi-cellular natural killer (NK) cell clusters enhance NK cell activation through localizing IL-2 within the cluster. *Scientific Reports* 7, 40623.
- Kim, T.-J., Kim, M., Kim, H.M., Lim, S.A., Kim, E.-O., Kim, K., Song, K.H., Kim, J., Kumar, V., Yee, C., *et al.* (2014). Homotypic NK cell-to-cell communication controls cytokine responsiveness of innate immune NK cells. *Scientific reports* 4, 7157-7157.
- Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O'Shea, M.A., and Fauci, A.S. (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181, 6738-6746.
- Kitayama, S., Zhang, R., Liu, T.Y., Ueda, N., Iriguchi, S., Yasui, Y., Kawai, Y., Tatsumi, M., Hirai, N., Mizoro, Y., *et al.* (2016). Cellular Adjuvant Properties, Direct Cytotoxicity of Re-differentiated V α 24 Invariant NKT-like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 6, 213-227.
- Kleinovink, J.W., Marijt, K.A., Schoonderwoerd, M.J.A., van Hall, T., Ossendorp, F., and Fransen, M.F. (2017). PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology* 6, e1294299.
- Klingemann, H.G., Wong, E., and Maki, G. (1996). A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2, 68-75.
- Kloess, S., Kretschmer, A., Stahl, L., Fricke, S., and Koehl, U. (2019). CAR-Expressing Natural Killer Cells for Cancer Retargeting. *Transfus Med Hemother* 46, 4-13.
- Knudson, K.M., Hicks, K.C., Alter, S., Schlom, J., and Gameiro, S.R. (2019). Mechanisms involved in IL-15 superagonist enhancement of anti-PD-L1 therapy. *J Immunother Cancer* 7, 82.
- Koch, J., and Tesar, M. (2017). Recombinant Antibodies to Arm Cytotoxic Lymphocytes in Cancer Immunotherapy. *Transfus Med Hemother* 44, 337-350.
- Kochenderfer, J.N., Dudley, M.E., Kassim, S.H., Somerville, R.P.T., Carpenter, R.O., Stetler-Stevenson, M., Yang, J.C., Phan, G.Q., Hughes, M.S., Sherry, R.M., *et al.* (2015). Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous

T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *Journal of Clinical Oncology* 33, 540-U531.

Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.A., Lanier, B.J., *et al.* (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116, 4099-4102.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Koneru, M., Purdon, T.J., Spriggs, D., Koneru, S., and Brentjens, R.J. (2015). IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* 4, e994446.

Konstantinidis, K.V., Alici, E., Aints, A., Christensson, B., Ljunggren, H.G., and Dilber, M.S. (2005). Targeting IL-2 to the endoplasmic reticulum confines autocrine growth stimulation to NK-92 cells. *Exp Hematol* 33, 159-164.

Kontermann, R.E. (2011). Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 22, 868-876.

Kontermann, R.E. (2012). Antibody-cytokine fusion proteins. *Arch Biochem Biophys* 526, 194-205.

Kontermann, R.E., and Brinkmann, U. (2015). Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 20, 838-847.

Krenciute, G., Prinzing, B.L., Yi, Z., Wu, M.F., Liu, H., Dotti, G., Balyasnikova, I.V., and Gottschalk, S. (2017). Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer Immunol Res* 5, 571-581.

Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and Cell Biology* 92, 221-229.

Kutzler, M.A., Robinson, T.M., Chattergoon, M.A., Choo, D.K., Choo, A.Y., Choe, P.Y., Ramanathan, M.P., Parkinson, R., Kudchodkar, S., Tamura, Y., *et al.* (2005). Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *Journal of Immunology* 175, 112-123.

Kuylensstierna, C., Bjorkstrom, N.K., Andersson, S.K., Sahlstrom, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.J., Ljunggren, H.G., Moll, M., and Sandberg, J.K. (2011). NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* 41, 1913-1923.

Lacy, M.Q., Jacobus, S., Blood, E.A., Kay, N.E., Rajkumar, S.V., and Greipp, P.R. (2009). Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leuk Res* 33, 1485-1489.

Lam, V.C., and Lanier, L.L. (2017). NK cells in host responses to viral infections. *Curr Opin Immunol* 44, 43-51.

Leach, J.L., Sedmak, D.D., Osborne, J.M., Rahill, B., Lairmore, M.D., and Anderson, C.L. (1996). Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 157, 3317-3322.

- Lee, E.Y., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003236.
- Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282, 2263-2266.
- Levitt, N.C., and Hickson, I.D. (2002). Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med* 8, 179-186.
- Li, R., Xie, C., Zhang, Y., Li, B., Donelan, W., Li, S.W., Han, S.H., Wang, X.L., Cui, T.X., and Tang, D.Q. (2014). Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological activity. *Protein Expres Purif* 96, 1-7.
- Li, S., Siriwon, N., Zhang, X., Yang, S., Jin, T., He, F., Kim, Y.J., Mac, J., Lu, Z., Wang, S., *et al.* (2017). Enhanced Cancer Immunotherapy by Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Engineered to Secrete Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res* 23, 6982-6992.
- Lieschke, G.J., Rao, P.K., Gately, M.K., and Mulligan, R.C. (1997). Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 35-40.
- Ling, P., Gately, M.K., Gubler, U., Stern, A.S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y.C., and Hakimi, J. (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 154, 116-127.
- Liu, D., Zhao, J., Song, Y., Luo, X., and Yang, T. (2019). Clinical trial update on bispecific antibodies, antibody-drug conjugates, and antibody-containing regimens for acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* 12, 15.
- Liu, E., Tong, Y., Dotti, G., Shaim, H., Savoldo, B., Mukherjee, M., Orange, J., Wan, X., Lu, X., Reynolds, A., *et al.* (2018). Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* 32, 520-531.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Lonberg, N., Taylor, L.D., Harding, F.A., Trounstein, M., Higgins, K.M., Schramm, S.R., Kuo, C.C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J.G., *et al.* (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859.
- London, C.A., Lodge, M.P., and Abbas, A.K. (2000). Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* 164, 265-272.
- Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D., and Nelson, B.H. (2000). The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *Journal of Immunology* 164, 2533-2541.
- Loskog, A., Giandomenico, V., Rossig, C., Pule, M., Dotti, G., and Brenner, M.K. (2006). Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia* 20, 1819-1828.
- Lotze, M.T., Chang, A.E., Seipp, C.A., Simpson, C., Vetto, J.T., and Rosenberg, S.A. (1986). High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. Responses, treatment-related morbidity, and histologic findings. *JAMA* 256, 3117-3124.

- Lotze, M.T., Frana, L.W., Sharrow, S.O., Robb, R.J., and Rosenberg, S.A. (1985). In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. *J Immunol* *134*, 157-166.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* *45*, 321-334.
- Lund, R.J., Chen, Z., Scheinin, J., and Lahesmaa, R. (2004). Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in th cells. *J Immunol* *172*, 6775-6782.
- Ma, J.S., Kim, J.Y., Kazane, S.A., Choi, S.H., Yun, H.Y., Kim, M.S., Rodgers, D.T., Pugh, H.M., Singer, O., Sun, S.B., *et al.* (2016). Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E450-458.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* *5*, 472-484.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural-Killer-Cell Stimulatory Factor (Interleukin-12 [IL-12]) Induces T-Helper Type-1 (Th1)-Specific Immune-Responses and Inhibits the Development of IL-4-Producing Th Cells. *Journal of Experimental Medicine* *177*, 1199-1204.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *P Natl Acad Sci USA* *97*, 11445-11450.
- Martinez, M., and Moon, E.K. (2019). CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* *10*, 128.
- Martyniszyn, A., Krah, A.C., Andre, M.C., Hombach, A.A., and Abken, H. (2017). CD20-CD19 Bispecific CAR T Cells for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Hum Gene Ther* *28*, 1147-1157.
- Masteller, E.L., Chuang, E., Mullen, A.C., Reiner, S.L., and Thompson, C.B. (2000). Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* *164*, 5319-5327.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., and Germann, T. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* *23*, 2202-2208.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z.H., Lacey, S.F., *et al.* (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New Engl J Med* *371*, 1507-1517.
- Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., *et al.* (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* *378*, 439-448.
- Mehta, R.S., and Rezvani, K. (2018). Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* *9*, 283.
- Met, O., Jensen, K.M., Chamberlain, C.A., Donia, M., and Svane, I.M. (2019). Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol* *41*, 49-58.
- Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhai, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., *et al.* (2009). Chimeric Receptors Containing CD137 Signal

Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. *Molecular Therapy* 17, 1453-1464.

Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82.

Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008.

Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6851-6855.

Morsut, L., Roybal, K.T., Xiong, X., Gordley, R.M., Coyle, S.M., Thomson, M., and Lim, W.A. (2016). Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 164, 780-791.

Mortier, E., Bernard, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2004). Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol* 173, 1681-1688.

Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem* 281, 1612-1619.

Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., and Ma, A. (2008). IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 205, 1213-1225.

Morvan, M.G., and Lanier, L.L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16, 7-19.

Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S.A., and Azargashb, E. (2011). The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharm Res* 10, 895-903.

Mueller, Y.M., Bojczuk, P.M., Halstead, E.S., Kim, A.H., Witek, J., Altman, J.D., and Katsikis, P.D. (2003). IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 101, 1024-1029.

Muul, L.M., Spiess, P.J., Director, E.P., and Rosenberg, S.A. (1987). Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* 138, 989-995.

Nakazawa, Y., Saha, S., Galvan, D.L., Huye, L., Rollins, L., Rooney, C.M., and Wilson, M.H. (2013). Evaluation of long-term transgene expression in piggyBac-modified human T lymphocytes. *J Immunother* 36, 3-10.

Nauts, H.C., Fowler, G.A., and Bogatko, F.H. (1953). A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta Med Scand Suppl* 276, 1-103.

- Neelapu, S.S., Locke, F.L., Bartlett, N.L., Lekakis, L.J., Miklos, D.B., Jacobson, C.A., Braunschweig, I., Oluwole, O.O., Siddiqi, T., Lin, Y., *et al.* (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377, 2531-2544.
- Neri, D., and Sondel, P.M. (2016). Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future. *Curr Opin Immunol* 40, 96-102.
- Nicol, A., Nieda, M., Koezuka, Y., Porcelli, S., Suzuki, K., Tadokoro, K., Durrant, S., and Juji, T. (2000). Human invariant $\alpha 24+$ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 99, 229-234.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204.
- Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., and Honjo, T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol* 8, 773-780.
- Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T., and Honjo, T. (1998). Immunological studies on PD-1-deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10, 1563-1572.
- Noguchi, T., Ward, J.P., Gubin, M.M., Arthur, C.D., Lee, S.H., Hundal, J., Selby, M.J., Graziano, R.F., Mardis, E.R., Korman, A.J., *et al.* (2017). Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res* 5, 106-117.
- O'Rourke, D.M., Nasrallah, M.P., Desai, A., Melenhorst, J.J., Mansfield, K., Morrisette, J.J.D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., *et al.* (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 9.
- Ober, R.J., Radu, C.G., Ghetie, V., and Ward, E.S. (2001). Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 13, 1551-1559.
- Oelsner, S., Friede, M.E., Zhang, C., Wagner, J., Badura, S., Bader, P., Ullrich, E., Ottmann, O.G., Klingemann, H., Tonn, T., *et al.* (2017). Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy* 19, 235-249.
- Oft, M. (2014). IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* 2, 194-199.
- Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., and Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13866-13871.
- Palmieri, D.J., and Carlino, M.S. (2018). Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Curr Oncol Rep* 20, 72.
- Pardoll, D.M. (2012a). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264.
- Pardoll, D.M. (2012b). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252-264.

- Park, J.J., Omiya, R., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Augustine, M.M., Yao, S., Tsushima, F., Narazaki, H., Anand, S., *et al.* (2010). B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 116, 1291-1298.
- Park, J.R., Digiusto, D.L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H.B., Bautista, C., Chang, W.C., Ostberg, J.R., *et al.* (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 15, 825-833.
- Patel, S.P., and Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 14, 847-856.
- Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89, 216-224.
- Pegram, H.J., Lee, J.C., Hayman, E.G., Imperato, G.H., Tedder, T.F., Sadelain, M., and Brentjens, R.J. (2012). Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 119, 4133-4141.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 37, 273-283.
- Pesce, S., Greppi, M., Grossi, F., Del Zotto, G., Moretta, L., Sivori, S., Genova, C., and Marcenaro, E. (2019). PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol* 10, 1242.
- Petersen, C.T., and Krenciute, G. (2019). Next Generation CAR T Cells for the Immunotherapy of High-Grade Glioma. *Front Oncol* 9, 69.
- Pipkin, M.E., and Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19, 301-308.
- Plas, D.R., Johnson, R., Pingel, J.T., Matthews, R.J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A.C., and Thomas, M.L. (1996). Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* 272, 1173-1176.
- Powles, T., Eder, J.P., Fine, G.D., Braiteh, F.S., Loria, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H.A., Petrylak, D.P., Teng, S.L., *et al.* (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515, 558-562.
- Puzanov, I., Diab, A., Abdallah, K., Bingham, C.O., 3rd, Brogdon, C., Dadu, R., Hamad, L., Kim, S., Lacouture, M.E., LeBoeuf, N.R., *et al.* (2017). Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer* 5, 95.
- Pyzik, M., Rath, T., Lencer, W.I., Baker, K., and Blumberg, R.S. (2015). FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin. *Journal of Immunology* 194, 4595-4603.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., *et al.* (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600-603.
- Ren, J., Liu, X., Fang, C., Jiang, S., June, C.H., and Zhao, Y. (2017). Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clin Cancer Res* 23, 2255-2266.

- Rhode, P.R., Egan, J.O., Xu, W.X., Hong, H., Webb, G.M., Chen, X.Y., Liu, B., Zhu, X.Y., Wen, J.H., You, L.J., *et al.* (2016). Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer Immunology Research* 4, 49-60.
- Robert, L., Tsoi, J., Wang, X., Emerson, R., Homet, B., Chodon, T., Mok, S., Huang, R.R., Cochran, A.J., Comin-Anduix, B., *et al.* (2014). CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res* 20, 2424-2432.
- Robinson, T.O., and Schluns, K.S. (2017). The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunol Lett* 190, 159-168.
- Rodgers, D.T., Mazagova, M., Hampton, E.N., Cao, Y., Ramadoss, N.S., Hardy, I.R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., *et al.* (2016). Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E459-468.
- Rohaan, M.W., Wilgenhof, S., and Haanen, J. (2019). Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch* 474, 449-461.
- Romano, E., Kusio-Kobialka, M., Foukas, P.G., Baumgaertner, P., Meyer, C., Ballabeni, P., Michielin, O., Weide, B., Romero, P., and Speiser, D.E. (2015). Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 6140-6145.
- Romee, R., Cooley, S., Berrien-Elliott, M.M., Westervelt, P., Verneris, M.R., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Ustun, C., DeFor, T.E., *et al.* (2018). First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* 131, 2515-2527.
- Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192, 5451-5458.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Chang, A.E., Schwartzentruber, D.J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W.M., Seipp, C.A., *et al.* (1993). Prospective Randomized Trial of High-Dose Interleukin-2 Alone or in Conjunction with Lymphokine-Activated Killer-Cells for the Treatment of Patients with Advanced Cancer. *J Natl Cancer I* 85, 622-632.
- Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., *et al.* (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319, 1676-1680.
- Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62-68.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17, 4550-4557.
- Rothe, A., Sasse, S., Topp, M.S., Eichenauer, D.A., Hummel, H., Reiners, K.S., Dietlein, M., Kuhnert, G., Kessler, J., Buerkle, C., *et al.* (2015). A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 125, 4024-4031.
- Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., and Lim, W.A. (2016). Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* 164, 770-779.

- Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229, 12-26.
- Ruella, M., Barrett, D.M., Kenderian, S.S., Shestova, O., Hofmann, T.J., Perazzelli, J., Klichinsky, M., Aikawa, V., Nazimuddin, F., Kozlowski, M., *et al.* (2016). Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 126, 3814-3826.
- Rupp, L.J., Schumann, K., Roybal, K.T., Gate, R.E., Ye, C.J., Lim, W.A., and Marson, A. (2017). CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep* 7, 737.
- Ryman, J.T., and Meibohm, B. (2017). Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 6, 576-588.
- Sahm, C., Schonfeld, K., and Wels, W.S. (2012). Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother* 61, 1451-1461.
- Sakuma, T., Barry, M.A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 443, 603-618.
- Saudemont, A., Jespers, L., and Clay, T. (2018). Current Status of Gene Engineering Cell Therapeutics. *Front Immunol* 9, 153.
- Savoldo, B., Ramos, C.A., Liu, E.L., Mims, M.P., Keating, M.J., Carrum, G., Kamble, R.T., Bollard, C.M., Gee, A.P., Mei, Z.Y., *et al.* (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1822-1826.
- Sazinsky, S.L., Ott, R.G., Silver, N.W., Tidor, B., Ravetch, J.V., and Wittrup, K.D. (2008). Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20167-20172.
- Schachter, J., Ribas, A., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., *et al.* (2017). Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet* 390, 1853-1862.
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.T., Berman, D.M., and Wolchok, J.D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 33, 1889-1894.
- Schirrmann, T., and Bussow, K. (2010). Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells. *Antibody Engineering*, Vol 2, Second Edition, 387-398.
- Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313, 1972-1975.
- Schonfeld, K., Sahm, C., Zhang, C., Naundorf, S., Brendel, C., Odendahl, M., Nowakowska, P., Bonig, H., Kohl, U., Kloess, S., *et al.* (2015). Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther* 23, 330-338.

- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Schroeder, H.W., Jr., Cavacini, L., and . (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125, S41-52.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 278-287.
- Sedykh, S.E., Prinz, V.V., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2018). Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther* 12, 195-208.
- Sekine, T., Marin, D., Cao, K., Li, L., Mehta, P., Shaim, H., Sobieski, C., Jones, R., Oran, B., Hosing, C., *et al.* (2016). Specific combinations of donor and recipient KIR-HLA genotypes predict for large differences in outcome after cord blood transplantation. *Blood* 128, 297-312.
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M., and Korman, A.J. (2013). Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunology Research* 1, 32-42.
- Sensel, M.G., Kane, L.M., and Morrison, S.L. (1997). Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. *Mol Immunol* 34, 1019-1029.
- Shah, N.N., Baird, K., Delbrook, C.P., Fleisher, T.A., Kohler, M.E., Rampertaap, S., Lemberg, K., Hurley, C.K., Kleiner, D.E., Merchant, M.S., *et al.* (2015). Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 125, 784-792.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., *et al.* (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 574, 37-41.
- Shimasaki, N., Coustan-Smith, E., Kamiya, T., and Campana, D. (2016). Expanded and armed natural killer cells for cancer treatment. *Cytotherapy* 18, 1422-1434.
- Shusterman, S., London, W.B., Gillies, S.D., Hank, J.A., Voss, S.D., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., Kimball, J., Albertini, M.R., Wagner, B., *et al.* (2010). Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* 28, 4969-4975.
- Sim, G.C., and Radvanyi, L. (2014). The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 25, 377-390.
- Smith, C.A., Gruss, H.J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., *et al.* (1993). CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 73, 1349-1360.

- Smith, L.K., Boukhaled, G.M., Condotta, S.A., Mazouz, S., Guthmiller, J.J., Vijay, R., Butler, N.S., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Krawczyk, C.M., *et al.* (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8(+) T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* 48, 299-312 e295.
- Sorman, A., Zhang, L., Ding, Z.J., and Heyman, B. (2014). How antibodies use complement to regulate antibody responses. *Molecular Immunology* 61, 79-88.
- Srivastava, S., Salter, A.I., Liggitt, D., Yechan-Gunja, S., Sarvothama, M., Cooper, K., Smythe, K.S., Dudakov, J.A., Pierce, R.H., Rader, C., *et al.* (2019). Logic-Gated ROR1 Chimeric Antigen Receptor Expression Rescues T Cell-Mediated Toxicity to Normal Tissues and Enables Selective Tumor Targeting. *Cancer Cell* 35, 489-503 e488.
- Stauber, D.J., Debler, E.W., Horton, P.A., Smith, K.A., and Wilson, I.A. (2006). Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2788-2793.
- Stewart, R., Morrow, M., Hammond, S.A., Mulgrew, K., Marcus, D., Poon, E., Watkins, A., Mullins, S., Chodorge, M., Andrews, J., *et al.* (2015). Identification and Characterization of MEDI4736, an Antagonistic Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody. *Cancer Immunol Res* 3, 1052-1062.
- Straathof, K.C., Pule, M.A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E.F., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Spencer, D.M., and Rooney, C.M. (2005). An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105, 4247-4254.
- Suarez, E.R., Chang de, K., Sun, J., Sui, J., Freeman, G.J., Signoretti, S., Zhu, Q., and Marasco, W.A. (2016). Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget* 7, 34341-34355.
- Sutlu, T., Nystrom, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S.E., and Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 23, 1090-1100.
- Swain, S.M., Kim, S.B., Cortes, J., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.M., Schneeweiss, A., Knott, A., *et al.* (2013). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 14, 461-471.
- Tam, Y.K., Maki, G., Miyagawa, B., Hennemann, B., Tonn, T., and Klingemann, H.G. (1999). Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther* 10, 1359-1373.
- Tay, M.Z., Wiehe, K., and Pollara, J. (2019). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Front Immunol* 10, 332.
- Thery, C., and Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13, 45-51.
- Thibult, M.L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., and Olive, D. (2013). PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 25, 129-+.
- Thomas, A., Teicher, B.A., and Hassan, R. (2016). Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol* 17, e254-e262.
- Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 33, 547-562.

- Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A.K., Maloney, D.G., Lindgren, C.G., Lin, Y., Pagel, J.M., Budde, L.E., *et al.* (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* *119*, 3940-3950.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H.G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O.G., and Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* *15*, 1563-1570.
- Topp, M.S., Gockbuget, N., and Stein, A.S. (2015). Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multi-centre, single-arm, phase 2 study (vol 16, pg 57, 2015). *Lancet Oncol* *16*, E158-E158.
- Tugues, S., Burkhard, S.H., Ohs, I., Vrohings, M., Nussbaum, K., Berg, J.V., Kulig, P., and Becher, B. (2015). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* *22*, 237-246.
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H.G., and Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* *100*, 1265-1273.
- Umar, A., Steele, V.E., Menter, D.G., and Hawk, E.T. (2016). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. *Seminars in Oncology* *43*, 65-77.
- Vacaflares, A., Freedman, S.N., Chapman, N.M., and Houtman, J.C. (2017). Pretreatment of activated human CD8 T cells with IL-12 leads to enhanced TCR-induced signaling and cytokine production. *Mol Immunol* *81*, 1-15.
- Veluchamy, J.P., Kok, N., van der Vliet, H.J., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., and Spanholtz, J. (2017). The Rise of Allogeneic Natural Killer Cells As a Platform for Cancer Immunotherapy: Recent Innovations and Future Developments. *Front Immunol* *8*, 631.
- Viapiano, M., Bhat, K., Abounader, R., Wright, K., Wick, W., and Purow, B. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology* *19*, 1574-1575.
- Vigna, E., and Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* *2*, 308-316.
- Vignali, D.A., and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* *13*, 722-728.
- Wagner, S., Mullins, C.S., and Linnebacher, M. (2018). Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. *World J Gastroenterol* *24*, 5418-5432.
- Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ* *22*, 1727-1741.
- Waldmann, T.A., Dubois, S., and Tagaya, Y. (2001). Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* *14*, 105-110.
- Wang, K.S., Zorn, E., and Ritz, J. (2001). Specific down-regulation of interleukin-12 signaling through induction of phospho-STAT4 protein degradation. *Blood* *97*, 3860-3866.

- Wang, W., Guo, X., Li, Y.M., Wang, X.Y., Yang, X.J., Wang, Y.F., and Wang, T.Y. (2018). Enhanced transgene expression using cis-acting elements combined with the EF1 promoter in a mammalian expression system. *Eur J Pharm Sci* 123, 539-545.
- Ward, E.S., Zhou, J., Ghetie, V., and Ober, R.J. (2003). Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol* 15, 187-195.
- Warren, H.S., Kinnear, B.F., Kastelein, R.L., and Lanier, L.L. (1996). Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol* 156, 3254-3259.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270, 985-988.
- Wei, J., Luo, C., Wang, Y., Guo, Y., Dai, H., Tong, C., Ti, D., Wu, Z., and Han, W. (2019). PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity. *J Immunother Cancer* 7, 209.
- Williams, B.A., Law, A.D., Routy, B., denHollander, N., Gupta, V., Wang, X.H., Chaboureaud, A., Viswanathan, S., and Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget* 8, 89256-89268.
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., *et al.* (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New Engl J Med* 377, 1345-1356.
- Wrangle, J.M., Velcheti, V., Patel, M.R., Garrett-Mayer, E., Hill, E.G., Ravenel, J.G., Miller, J.S., Farhad, M., Anderton, K., Lindsey, K., *et al.* (2018). ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 19, 694-704.
- Xu, C., Zhang, Y., Rolfe, P.A., Hernandez, V.M., Guzman, W., Kradjian, G., Marelli, B., Qin, G., Qi, J., Wang, H., *et al.* (2017). Combination Therapy with NHS-muLL12 and Avelumab (anti-PD-L1) Enhances Antitumor Efficacy in Preclinical Cancer Models. *Clin Cancer Res* 23, 5869-5880.
- Xu, W.X., Jones, M., Liu, B., Zhu, X.Y., Johnson, C.B., Edwards, A.C., Kong, L., Jeng, E.K., Han, K.P., Marcus, W.D., *et al.* (2013). Efficacy and Mechanism-of-Action of a Novel Superagonist Interleukin-15: Interleukin-15 Receptor alpha Su/Fc Fusion Complex in Syngeneic Murine Models of Multiple Myeloma. *Cancer Research* 73, 3075-3086.
- Yamamoto, K., Shibata, F., Miyasaka, N., and Miura, O. (2002). The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1245-1252.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., *et al.* (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of Immunology* 169, 5538-5545.
- Yeku, O.O., and Brentjens, R.J. (2016). Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans* 44, 412-418.
- Younes, A., Pro, B., Robertson, M.J., Flinn, I.W., Romaguera, J.E., Hagemeister, F., Dang, N.H., Fiumara, P., Loyer, E.M., Cabanillas, F.F., *et al.* (2004). Phase II clinical trial of interleukin-12 in

patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clin Cancer Res* 10, 5432-5438.

Young, P.A., Morrison, S.L., and Timmerman, J.M. (2014). Antibody-cytokine fusion proteins for treatment of cancer: engineering cytokines for improved efficacy and safety. *Semin Oncol* 41, 623-636.

Yu, P., Steel, J.C., Zhang, M., Morris, J.C., and Waldmann, T.A. (2010). Simultaneous blockade of multiple immune system inhibitory checkpoints enhances antitumor activity mediated by interleukin-15 in a murine metastatic colon carcinoma model. *Clin Cancer Res* 16, 6019-6028.

Zhang, C., Burger, M.C., Jennewein, L., Genssler, S., Schonfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Tonn, T., *et al.* (2016). ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst* 108.

Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T., and Wels, W.S. (2017). Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol* 8, 533.

Zhang, C., Zhang, J.H., Niu, J.F., Zhou, Z.X., Zhang, J., and Tian, Z.G. (2008). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* 69, 490-500.

Zhang, L., Kerkar, S.P., Yu, Z., Zheng, Z., Yang, S., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2011). Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther* 19, 751-759.

Zhang, P., Raju, J., Ullah, M.A., Au, R., Varelias, A., Gartlan, K.H., Olver, S.D., Samson, L.D., Sturgeon, E., Zomerdijs, N., *et al.* (2019). Phase I Trial of Inducible Caspase 9 T Cells in Adult Stem Cell Transplant Demonstrates Massive Clonotypic Proliferative Potential and Long-term Persistence of Transgenic T Cells. *Clin Cancer Res* 25, 1749-1755.

Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C., and Rothstein, T.L. (2007). PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol* 37, 2405-2410.

Zhong, X.S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I., and Sadelain, M. (2010). Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 18, 413-420.

Zhou, X.O., Dotti, G., Krance, R.A., Martinez, C., Kamble, R.T., Naik, S., Durett, A.G., Dakhova, O., Savoldo, B., Di Stasi, A., *et al.* (2015). Inducible Caspase-9 Suicide Gene Controls Adverse Effects from Alloplete T Cells after Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Molecular Therapy* 23, S103-S103.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28, 445-489.

Zhu, X., Marcus, W.D., Xu, W., Lee, H.I., Han, K., Egan, J.O., Yovandich, J.L., Rhode, P.R., and Wong, H.C. (2009). Novel human interleukin-15 agonists. *J Immunol* 183, 3598-3607.

Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8, 467-477.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|--------------------|--|-----------------|---|
| °C | Grad Celsius | FKBP | <i>FK506-binding protein</i> |
| µg | Mikrogramm | g | Erdbeschleunigung |
| µl | Mikroliter | G418 | Geneticin |
| µm | Mikrometer | G-CSF | <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| µM | Mikromolar | GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| Abb. | Abbildung | GLR | gemischte Lymphozytenreaktion |
| ADCC | <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> | GM-CSF | <i>granulocyte-macrophage colony-</i> |
| AF | Alexa Fluor | GMP | <i>good manufacturing practice</i> |
| AICD | <i>activation-induced cell death</i> | GvH | <i>graft-versus-host</i> |
| ALL | Akute myeloische Leukämie | GvHD | <i>graft-versus-host disease</i> |
| AML | Allophycocyanin (Fluorochrom) | Gy | Gray |
| APC | <i>antigen-presenting cell</i> | h | Stunde |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> | HA | <i>human influenza hemagglutinin</i> |
| BiTe | <i>bi-specific T-cell engager</i> | HER2 | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| bp | Basenpaar | hESC | <i>human embryonic stem cells</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin | HLA | <i>human leukocyte antigen</i> |
| BV | Brilliant™ Violet | HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| ca. | circa | HSZT | Hämatopoetische Stammzelltransplantation |
| CAIX | <i>carbonic anhydrase IX</i> | iCAR | Inhibitorischer CAR |
| CAR | <i>chimeric antigen receptor</i> | iCasp9 | <i>inducible caspase-9</i> |
| Cas | CRISPR-associated | ICOS | <i>inducible costimulator domain</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> | ICOS | <i>inducible co-stimulator</i> |
| CEA | <i>carcinoembryonic antigen</i> | IFNγ | Interferon-γ |
| CFSE | Carboxyfluoresceinsuccinimidylester | Ig | Immunglobulin |
| C _H | <i>constant heavy chain</i> | IL | Interleukin |
| CIP | <i>Calf Intestinal Phosphatase</i> | IMAC | Immobilisierte Metallchelat- |
| C _L | <i>constant light chain</i> | | Affinitätschromatographie |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie | IP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| cm | Zentimeter | iPSC | <i>induced pluripotent stem cell</i> |
| CMV | Cytomegalievirus | IRES | <i>internal ribosome entry site</i> |
| CRISPR | <i>clustered regularly interspaced short</i> | ITAM | <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> |
| CRS | <i>cytokine release syndrome</i> | ITIM | <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i> | ITSM | <i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i> |
| CV | Calcein Violet AM | IU | <i>international unit</i> |
| DC | <i>dendritic cell</i> | Jak | Janus Kinase |
| ddH ₂ O | Doppelt destilliertes Wasser | k.A. | keine Angabe |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | kb | Kilobase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Kd | Dissoziationskonstante |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | kDa | Kilo-Dalton |
| dNTP | Desoxynukleotid-5'-triphosphat | KIR | <i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i> |
| DRK | Deutsches Rotes Kreuz | LAG-3 | <i>Lymphocyte activation gene-3</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | LAK | Lymphokin-aktivierte Killerzelle |
| E/T | Effektor/Target | mA | Milliampère |
| EBV | Epstein-Barr-Virus | MART-1 | <i>melanoma antigen recognized by T cells</i> |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> | M-CSF | <i>macrophage colony-stimulating factor</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | MDM2 | <i>mouse double minute 2 homolog</i> |
| EGFP | <i>enhanced GFP</i> | MDSC | <i>myeloid-derived suppressor cell</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> | MFI | <i>mean fluorescence intensity</i> |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> | mg | Milligramm |
| EpCAM | <i>epithelial cell adhesion molecule</i> | MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum | MICA/B | <i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i> |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> | mIL-12 | murines IL-12 |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> | Min | Minute |
| FcRn | neonatale Fc-Rezeptor | MIP-1α | <i>macrophage inflammatory protein-1α</i> |
| FcRγ | Fc-Rezeptor γ | ml | Milliliter |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> | mM | Millimolar |
| FDA | <i>food and drug administration</i> | MoDC | <i>monocyte-derived dendritic cell</i> |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate | mRNA | <i>messenger Ribonukleinsäure</i> |
| | | NCR | <i>natural cytotoxicity receptor</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------|--|----------------|--|
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T-cells</i> | SFFV | <i>spleen focus-forming virus</i> |
| ng | Nanogramm | shRNA | <i>short hairpin RNA</i> |
| NK- | Natürliche Killerzelle | SP | Signalpeptid |
| nM | Nanomolar | STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| nm | Nanometer | T _A | <i>annealing-Temperatur</i> |
| ns | Nicht signifikant | TAA | Tumor-assoziiertes Antigen |
| NSCLC | <i>non-small-cell lung cancer</i> | Tab. | Tabelle |
| PAA | Polyacrylamid | TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| PBMCs | <i>peripheral blood mononuclear cell</i> | TBST | <i>tris-buffered saline-TWEEN 20</i> |
| PBMCs | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> | TCR | <i>T cell receptor</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> | T _d | Verdoppelungszeit |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion | TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| PD-1 | <i>programmed cell death protein 1</i> | TGF-β | <i>transforming growth factor beta</i> |
| PD-L1 | <i>programmed cell death-ligand 1</i> | TIL | <i>tumor infiltrating lymphocytes</i> |
| PE | Phycoerythrin | TIM-3 | <i>T cell immunoglobulin-3</i> |
| PEI | Polyethylenimin | TLR | Toll-like-Rezeptor |
| PHA-L | Phytohämagglutinin-L | TM | Transmembran |
| PI | Propidiumiodid | TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase | TNFα | <i>tumor necrosis factor-α</i> |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat | TRAIL | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> |
| PKC | Proteinkinase C | Treg | <i>regulatory T cell</i> |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat | TRUCK | <i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i> |
| PNGase | Peptid-N-Glykosidase F | TSA | Tumor-spezifisches Antigen |
| pSTAT | Phospho-STAT | U | <i>enzyme Unit</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid | u.a. | unter anderem |
| RIPA | <i>radioimmunoprecipitation assay</i> | ULBP | <i>UL-16 binding protein</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure | UniCAR | <i>universal chimeric antigen</i> |
| rpm | rounds per minute | UV | Ultraviolett |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute | V | Volt |
| RT | Raumtemperatur | v/v | <i>volume/volume percent</i> |
| Rα | Rezeptor-α | VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| s | Sekunde | V _H | <i>variable heavy chain</i> |
| s.c. | subkutan | V _L | <i>variable light chain</i> |
| scFv | <i>single chain fragment variable</i> | VSV-G | <i>vesicular stomatitis virus protein-G</i> |
| sclL-12 | <i>single chain IL-12</i> | w/v | <i>weight/volume percent</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulphate</i> | WPRE | <i>WHP Posttranscriptional Regulatory Element</i> |
| SDS- | <i>SDS-polyacrylamide gel electro-phoresis</i> | ZAP-70 | <i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i> |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> | γ-Tub | γ-Tubulin |

Publikationen

Veröffentlichungen

Pollak, N., Lindner, A., Imig, D., Kuritz, K., Heinrich, I., Koester, J. "Mcl-1 governs sublethal caspase-8 activation and transmitotic resistance to extrinsic apoptosis" (eingereicht)

Oelsner, S., A. Waldmann, A. Billmeier, J. Roder, A. Lindner, E. Ullrich, R. Marschalek, G. Dotti, G. Jung, L. Grosse-Hovest, P. Oberoi, P. Bader and W. S. Wels (2019). "Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth." Int J Cancer 145(7): 1935-1945.

Zhang, C., P. Oberoi, S. Oelsner, A. Waldmann, A. Lindner, T. Tonn and W. S. Wels (2017). "Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity." Front Immunol 8: 533.

Ausgewählte Posterpräsentationen

Aline Lindner, Anja Waldmann, Christina Kopp Congcong Zhang, Winfried S. Wels

"PD-L1-specific immunocytokines carrying an IL-15 superagonist augment functionality and antitumor activity of CAR-engineered NK cells"

NK2019 The 18th Meeting of the Society for Natural Immunity (Immunotherapy), Luxemburg, September 2019

Aline Lindner, Anja Waldmann, Christina Kopp Congcong Zhang, Winfried S. Wels

"PD-L1-specific immunocytokines augment functionality and antitumor activity of CAR-engineered NK cells"

CIMT 2019 (Cancer Immunotherapy), Mainz, Mai 2019

Aline Lindner, Anja Waldmann, Christina Kopp Congcong Zhang, Winfried S. Wels

"PD-L1-specific immunocytokines augment functionality and antitumor activity of CAR-engineered NK cells"

10th International Cellular Therapy Symposium (Modulation of the Tumor-Immune Microenvironment), Erlangen, März 2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Mein erster Dank gebührt hierbei Herrn Prof. Dr. Winfried Wels für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe an diesem interessanten Dissertationsthema zu arbeiten. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen, für die konstruktive Kritik sowie für die gewissenhaften Korrekturen, welche mir halfen diese Doktorarbeit abzuschließen.

Ich danke Prof. Dr. Beatrix Süß und Prof. Dr. Bodo Laube für die Übernahme der Betreuung von Seiten des Fachbereichs Biologie der TU Darmstadt.

Bei Dr. Stefan Stein, Annette Trzmiel und Tefik Merovci aus dem Georg-Speyer Haus möchte ich mich herzlich für die Hilfe beim FACS-basierten Zellsortieren bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Steffen Luft für die Beratung und Hilfestellung bei IT-Problemen. Ein besonderer Dank geht auch an Christina Kopp, für die gute Zusammenarbeit zum Teilprojekt der IL-15-basierten Immunzytokine.

Von Herzen danke ich auch allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Wels, welche mich während meiner Doktorarbeit begleitet und mit Rat und Tat unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht hierbei an Anita Bhatti, Malena Bodden, Thorsten Geyer, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Anne Scherer, Barbara Uherek und Anja Waldmann: Es war mir eine Freude mit euch zu Arbeiten! Ohne euch wäre meine Doktorarbeit in dieser Form nicht entstanden und meine Zeit in Frankfurt wäre ziemlich einsam gewesen!

Abschließend möchte ich ein großes Dankeschön an meine Eltern, Familie und Freunde richten, welche mir den nötigen Rückhalt für meine Doktorarbeit gegeben haben.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name Aline Häcker (geb. Lindner)
Geburtsdatum & -ort 15. März 1990, Leonberg
Staatsangehörigkeit Deutsch
Adresse Platanenstr. 20
665933 Frankfurt am Main
Email aline.lindner@gmx.de



Ausbildung

| | |
|---------------------|---|
| Jan 2016 - 2020 | Promotion im Georg-Speyer-Haus, Institut für Tumorbilogie und Experimentelle Therapie, Frankfurt, Betreuer: Prof. Dr. W. Wels |
| Nov 2012 – Mai 2015 | M.Sc. Technische Biologie, Universität Stuttgart, Note: 1,1 Masterarbeit: „Regulation of apoptotic sensitivity during cell cycle“, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart Betreuer: Prof. Dr. Peter Scheurich |
| Okt 2009 – Nov 2012 | B.Sc. Technische Biologie, Universität Stuttgart, Note: 2,0 Bachelorarbeit: "Cell cycle and TRAIL-induced apoptosis", Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart Betreuer: Prof. Dr. Peter Scheurich |
| 2000 – 2009 | Theodor-Heuss-Gymnasium in Mühlacker Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5) |

Praktika und Studentische Nebentätigkeiten

| | |
|---|---|
| Sep 2012 – Sep 2013 | Studentische Hilfskraft Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie Eigenständiges Bearbeiten von Experimenten im Bereich: Apoptoseresistenz im 3D-Tumormodell |
| Okt 2012 - Feb 2013 Okt 2011 - Feb 2012 Okt 2010 - Feb 2011 | Studentische Hilfskraft Universität Stuttgart, Fakultät Technische Biologie Betreuung Erstsemester Mikroskopiekurs |
| Sep 2012 - Okt 2012 Sep 2011 - Okt 2011 | Studentische Hilfskraft Universität Stuttgart, Fakultät Technische Biologie Betreuung Praktikumskurs Tierphysiologie |